

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)**B14**

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C07C 237/08, 279/14, 271/22, C12N 15/87, 15/88, A61K 9/127</b>		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 97/30024</b> (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>21. August 1997 (21.08.97)</b>
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP97/00629</b>		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ARIPO Patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: <b>12. Februar 1997 (12.02.97)</b>			
(30) Prioritätsdaten: 196 05 175.4 13. Februar 1996 (13.02.96) DE			
(71)(72) Anmelder und Erfinder: SOUROVOI, Andrej [RU/DE]; Kapuzinergasse 18, D-72108 Rottenburg (DE).			<b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): JUNG, Guenther [DE/DE]; Ob der Grafenhalde 5, D-72076 Tübingen (DE).			
(74) Anwälte: RUFF, Michael usw.; Willy-Brandt-Strasse 28, D-70173 Stuttgart (DE).			
<b>(54) Title: LIPIDS AND THEIR USE, FOR EXAMPLE, IN LIPOSOMES</b>			
<b>(54) Bezeichnung: LIPIDVERBINDUNGEN UND DEREN VERWENDUNG Z.B. IN LIPOSOMEN</b>			
<b>(57) Abstract</b>			
The invention concerns lipids suitable for the transport of biologically active substances or molecules in cells. A preferred lipid is L-lysine-bis-(O,O'- <i>cis</i> -9-octadecenoyl- $\beta$ -hydroxyethyl) amide dihydrochloride or one of its optical isomers. In addition, the invention concerns complexes of such lipids with polyanions such as DNA and RNA, and ternary complexes of the lipids described with polyanions and polycations. Finally, the invention concerns liposome formulations made from biologically active substances and the lipids described, as well as methods of transporting polyanions, polycations or biologically active substances through biological membranes by means of these lipids.			
<b>(57) Zusammenfassung</b>			
Die Erfindung betrifft neue Lipidverbindungen, die zum Transport biologisch aktiver Substanzen oder Moleküle in Zellen geeignet sind. Eine bevorzugte Verbindung nach der Erfindung ist L-Lysin-bis-(O,O'- <i>cis</i> -9-octadecenoyl- $\beta$ -hydroxyethyl)amid-dihydrochlorid oder ein optisches Isomer davon. Weiter umfaßt die Erfindung Komplexe aus den neuen Lipidverbindungen mit Polyanionen wie beispielsweise DNA oder RNA, sowie ternäre Komplexe aus den neuen Lipidverbindungen mit Polyanionen und Polycationen. Schließlich werden neben Liposom-Formulierungen aus biologisch aktiven Substanzen und den neuen Lipidverbindungen auch Verfahren zum Transport von Polyanionen, Polycationen oder biologisch aktiven Substanzen durch biologische Membranen mit Hilfe der neuen Lipidverbindungen beschrieben.			

#### ***LEDIGLICH ZUR INFORMATION***

**Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.**

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estonland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Beschreibung

5

## LIPIDVERBINDUNGEN UND DEREN VERWENDUNG Z.B. IN LIPOSOMEN

Die Erfindung betrifft Lipidverbindungen und deren Verwendung, beispielsweise zum Transport biologisch aktiver Substanzen oder Moleküle in Zellen.

10

Liposome sind sphärische, in sich geschlossene Strukturen aus Lipiddoppelschichten, die in ihrem Inneren einen Teil des Lösemittels, in dem sie schwimmen, einlagern. Sie können aus einer oder mehreren konzentrischen Membranen bestehen und 15 ihre Größe liegt im Bereich von einigen Nanometern bis einigen Dutzend Mikrometern.

Liposome sind hauptsächlich aus amphiphilen Molekülen gebildet, die durch eine hydrophile (oft polares Ende genannte) 20 Gruppe und eine hydrophobe Gruppe (unpolares Ende) im selben Molekül gekennzeichnet sind. In den meisten Fällen sind liposombildende Moleküle nicht wasserlöslich. Unter bestimmten Umständen können sie jedoch kolloide Dispersionen bilden.

25 Liposome können groß oder klein sein und sie können aus einer bis mehreren hundert konzentrischen Doppelschichten ausgebildet sein. Bezuglich der Größe und Art der Schichten (Lamellen) können sie in mehrschichtige Vesikel (MLV, multi-lamellar vesicles), kleine einschichtige Vesikel (SUV, small uni-lamellar vesicles) und große einschichtige Vesikel (LUV, large uni-lamellar vesicles) eingeteilt werden.

30 SUV besitzen einen Durchmesser von 20 bis 600 nm und bestehen aus einer einzigen Lipiddoppelschicht, die die innere wässrige Zone umgibt. LUV besitzen einen Durchmesser von 600 bis 30000 nm. MLV schwanken in ihrer Größe stark mit bis zu 10000 nm

und enthalten mehr als eine Lipiddoppelschicht, daher sind sie in ihrer Struktur in mehrere Zonen geteilt.

Liposomen können auf zahlreichen Wegen hergestellt werden.

5 Das Verfahren der sogenannten "Dünnschichthydratisierung" führt zur Bildung heterogener Dispersionen, die hauptsächlich MLV enthalten. Bei Verwendung geladener Lipidzusammensetzungen können ziemlich hohe Fraktionen von LUV hergestellt werden. Diese Dispersionen können weiter behandelt werden (mechanisch, elektrostatisch oder chemisch), um Lösungen von SUV herzustellen. Meist umfassen diese Verfahren eine Extrusion durch Filter mit Poren unterschiedlicher Durchmesser oder Schallbehandlung.

15 Alternativ können Liposome durch Lyophilisierung hergestellt werden, wobei der Lipidfilm dann in einem flüchtigen Lösemittel gelöst (zum Beispiel in tert-Butylalkohol), eingefroren und lyophilisiert wird.

20 In der Zeitschriften- und Patentliteratur wurden eine Reihe von Methoden zur Herstellung von Liposomen beschrieben wie: Szoka und Papahadjopoulos in: Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9 (1980), 467-508 sowie US-Patente Nr. 4229360, 4241046, 4235871.

25 Ein wichtiges Merkmal der Liposome ist ihre Fähigkeit, hydrophile oder hydrophobe Moleküle zu lösen, zu schützen und zu tragen. Für negativ geladene Arzneistoffe, einschließlich einiger Proteine, können positiv geladene Liposome verwendet werden. Es wurden Verbesserungen der Therapie beobachtet, trotz der bekannten Tatsache, daß positiv geladene Liposome toxisch wirken können.

35 In den letzten zwanzig Jahren wurden verschiedene DNA-Transfektionsverfahren entwickelt. Diese Verfahren umfassen Calciumphosphatfällung, das DEAE-Dextranverfahren, Elektropora-

tion, Mikroinjektion, rezeptorvermittelte Endozytose, Liposome und Virusvektoren. Die meisten dieser Verfahren weisen jedoch einige gravierende Nachteile auf: sie sind entweder zu uneffizient, zu toxisch oder zu kompliziert und aufwendig für 5 eine effektive Anwendung in biologischen und therapeutischen Behandlungsplänen in vitro und in vivo. Beispielsweise ist das am häufigsten in vitro angewendete Calciumphosphatfällungsverfahren zu uneffizient (durchschnittliche Transfektionsfrequenz 1 in  $10^4$  Zellen). Elektroporation ist viel 10 effizienter als das Calciumphosphatverfahren. Das Verfahren ist jedoch zu aggressiv (maximale Effizienz wird bei ungefähr 50 % Zelltötung erreicht) und außerdem erfordert dieses Verfahren eine Spezialapparatur. Mikroinjektion ist effizient, aber sie ist zu mühsam und nicht praktisch anzuwenden. Insgesamt 15 können diese Verfahren nicht in vivo angewendet werden.

Ein Endozytoseverfahren mit Rezeptorvermittlung verwendet Polylysin als Basispolymer zur Wechselwirkung mit und Verpackung von DNA. Polylysin wurde mit verschiedenen Liganden 20 (Transferrin, Insulin, Asialoorosomukoid oder Galactose) modifiziert, um modifizierte Protein-DNA-Komplexe auf Zelloberflächenrezeptoren zu bringen: Wu, G.Y. et al. in: J. Biol. Chem. (1987) 262:4429-4432, Cotten, M. et al. in: Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1990) 87:4033-4037, Huckett, 25 B. et al. in: Biochem. Pharmacol. (1990) 40:253-263, Plank, C. et al. in: Bioconjugate Chem. (1992), 533-539. Das Verfahren wurde durch Verwendung von inaktivierten Adenoviren drastisch verbessert, um den Austritt von DNA aus Endosomen zu erleichtern, siehe: Wagner, E. et al. in: Proc. Natl. Acad. 30 Sci. (USA) (1992) 89:6099-6103, Christiano, R. J. et al. in: Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1993) 90:2122-2126. Der größte Nachteil der beschriebenen Ansätze betrifft die Unmöglichkeit, die Chemie der Proteinkonjugation zu steuern und solche Konjugate auf reproduzierbare Weise herzustellen.

Zur Zeit werden die besten Transfektionsergebnisse *in vitro* und *in vivo* mit Retroviren, Adenoviren und anderen erhalten, siehe beispielsweise: Kerr, W. G. und Mule J. J. in: *J. Leucocyte Biol.* (1994) 56:210-214, Hwu, P. und Rosenberg, S. A. 5 in: *Cancer Detect. Prevent.* (1994) 18:43-50, Rosenfeld, M. A. et al. in: *Cell* (1992) 68:143-155. Trotzdem weist die Verwendung von viralen Vektoren verschiedene Aspekte auf wie die Notwendigkeit extensiver Zellkulturmanipulationen, geringe Titer für bestimmte Virussysteme und den Zelltropismus des 10 Virus. Außerdem kann die Immunreaktivität gegen virale Vektoren Probleme bereiten. Insbesondere sind auch die Sicherheitsanforderungen in Zusammenhang mit der Verwendung von viralen Vektoren bisher noch nicht vollständig gelöst.

15 Liposomen wurden auch verwendet, um *in vitro* und *in vivo* DNA in Zellen einzuführen. Die erfolgreichsten Liposomsysteme verwenden kationische Lipide wie Dioleyloxypropyltrimethylammonium (DOTMA, das einen Reaktionspartner bildet in Kombination mit Phosphatidylethanolamin (PE)), Dioleyloxypropyltrimethylammoniummethylsulfat (DOTAP), Dimethylaminoethan-carbamoylcholesterol, Dioctadecylamidoglycylspermin, 2,3-Dioleyloxy-N-(2(spermincarboxamido)ethyl)-N,N-dimethyl-1-propanamin (DOSPA), das einen Reaktionspartner in Kombination mit PE bildet, siehe Felgner, P. L. in: *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1987) 84:7413-7417, US-Patent Nr. 5208036, Leventis, R. und Silvius, J. R. in: *Biochimica et Biophysica Acta* (1990), 124-132, Gao, X. und Huang, L. in: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1991) 179:280-285, Behr, J.-P. et al. 20 in: *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1989) 86:6982-6986.

25 30 Der Vorteil der Verwendung der oben genannten Verbindungen liegt darin, daß das kationische Liposom einfach mit der DNA gemischt und der Zelle zugegeben wird. Die Transfektionseffizienz ist üblicherweise hoch im Vergleich zu anderen physikalischen Methoden der DNA-Übertragung. Außerdem zur Abgabe von DNA wurde eine spezifische Verbindung zur Abgabe von mRNA 35

und Proteinen in kultivierte Zellen verwendet, siehe Malone, R. et al. in: Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1989) 86:6077-6081 und Debs, R. et al. in: J. Biol. Chem. (1990) 265:10189-10193. Einige der oben genannten Verbindungen wurden zur 5 Übertragung von Reportergenen oder therapeutisch nützlichen Genen in vivo verwendet, siehe Nabel, G. J. et al. in: Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1993) 90:11307-11311, Zhu, N. et al. in: Science (1993) 261:209-211. Schließlich wurde ein DNA-Transfektionsprotokoll entwickelt, der das cyclische kationi- 10 sche Peptid Gramicidin S und PE verwendet, siehe Legendre, J.-Y. und Szoka, F. C. in: Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1993) 90: 893-897. Das oben genannte System verwendet mit Vorteil die Bindungsfähigkeit von DNA und die Membrandestabilisierungseigenschaften von Gramicidin S.

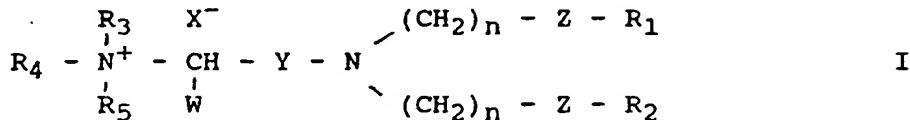
15 Der größte Nachteil der kationischen Liposomen betrifft ihre relativ hohe Zytotoxizität. Außerdem sind die meisten der oben genannten Verbindungen in Gegenwart von Serum nicht wirksam oder zeigen eine stark reduzierte Wirksamkeit. Die 20 meisten erfordern die Verwendung von PE, möglicherweise weil PE Intramembran-Lipid-Zwischenverbindungen bilden kann, die die Membranfusion erleichtern. Untersuchungen des der Transfektion zugrundeliegenden Mechanismus unter Verwendung von kationischen Lipiden wurden bisher noch nicht vollständig 25 abgeschlossen. Es besteht daher ein Bedarf an einer weniger toxischen, nicht infektiösen und wirksameren Abgabe von biologischen Molekülen, insbesondere in das Zytoplasma und die Kerne von lebenden Zellen.

30 Die Erfindung stellt sich die Aufgabe, die geschilderten und weitere Nachteile des Standes der Technik zu vermeiden. Dabei sollen in erster Linie neue Lipidverbindungen zur Verfügung gestellt werden, die es erlauben, den Transport biologisch aktiver Stoffe oder Moleküle durch Membranen und damit in 35 Zellen oder Zellorganellen zu verbessern.

Diese Aufgabe wird in erster Linie gelöst durch die Verbindungen gemäß Anspruch 1. Bevorzugte Verbindungen sind in den Unteransprüchen 2 bis 11 beansprucht. Erfindungsgemäße Folgeprodukte und Anwendungen der neuen Verbindungen ergeben sich 5 aus den Ansprüchen 12 bis 24 (Komplexe), den Ansprüchen 25 und 26 (Verfahren zur Herstellung der Komplexe), Anspruch 27 (Liposom), den Ansprüchen 28 bis 32 (Liposom-Formulierungen) und den Ansprüchen 33 bis 42 (Verfahren zum Transport von 10 Substanzen oder Stoffen durch Membranen). Der Wortlaut sämtlicher Ansprüche wird hiermit durch Bezugnahme zum Inhalt dieser Beschreibung gemacht.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen lassen sich durch die Formel I wie folgt darstellen:

15



20

worin

- $R_1$  und  $R_2$  gleich oder verschieden sind und eine Alkyl-, Alkenyl- oder Alkinylgruppe mit 6 bis 24 Kohlenstoffatomen sind;
- $R_3$ ,  $R_4$  und  $R_5$  gleich oder verschieden sind und Wasserstoff, Alkyl oder Alkylamin, jeweils mit 1 bis 8 Kohlenstoffatomen, oder eine Aminosäure, ein Aminosäurederivat, ein Peptid oder ein Peptidderivat sind;
- $W$  Wasserstoff, ein Carboxylrest oder ein Seitenkettenrest von Aminosäuren, Aminosäurederivaten, Peptiden oder Peptidderivaten ist;
- $Y$  eine Verbindungsgruppe (linking group) mit mindestens einem Atom, das nicht Wasserstoff ist, insbesondere  $-CO-$ ,  $-(CH_2)_mCO-$ ,  $-(CH_2-)_m$ ,  $-(CHOCH_2-)_m$ , jeweils mit  $m$  gleich 1 bis 20,  $-CH_2-S-CH_2-$ ,  $-CH_2-SO-CH_2-$ ,  $-CH_2-SO_2-CH_2-$ ,  $-CH_2-SO_2-$  oder  $-SO_2-$  ist;

- z eine Ester-, Ether- oder Amidbindung ist;
- n gleich 1 bis 8 ist; und
- x ein Anion, insbesondere ein pharmazeutisch annehmbares Anion ist.

5

Bei den erfindungsgemäßen Verbindungen handelt es sich um Lipide (Detergentien, Tenside), deren wesentliche Eigenschaften bereits beschrieben wurden. Die von der Formel I umfaßten Verbindungen können in Form ihrer optischen Isomere (R- oder 10 S-Konfiguration) oder in Form deren Gemische vorliegen.

Gemäß Formel I sind die Lipidverbindungen in Form von aus Ionen gebildeten Salzen dargestellt. Dies ergibt sich daraus, daß auch an sich neutrale Verbindungen in (wässriger) Lösung 15 in Form von Ionen vorliegen. Selbstverständlich soll die Erfindung gegebenenfalls auch die entsprechenden neutralen Verbindungen umfassen. Verbindungen der Formel I können durch entsprechende Wahl der Substituenten weitere Ladungen tragen, beispielsweise im Substituenten W durch entsprechende Wahl 20 des Seitenkettenrestes einer Aminosäure.

Zum besseren Verständnis der Ansprüche und der Beschreibung werden die folgenden Definitionen gemacht:

Alkyl bezeichnet ein voll gesättigtes verzweigtes oder 25 unverzweigtes Kohlenstoffkettenradikal.  
Alkenyl bezeichnet ein verzweigtes oder unverzweigtes ungesättigtes Kohlenstoffkettenradikal mit einer oder mehreren Doppelbindungen.  
Alkinyl bezeichnet ein verzweigtes oder unverzweigtes ungesättigtes Kohlenstoffkettenradikal mit einer oder mehreren 30 Dreifachbindungen.

Aminosäure bezeichnet eine monomere Einheit eines Peptids, Polypeptids oder Proteins. Die zwanzig Proteinaminosäuren (L-Isomere) sind: Alanin ("A"), Arginin ("R"), Asparagin ("N"), 35 Aspariginsäure ("D"), Cystein ("C"), Glutamin ("Q"), Glutaminsäure ("E"), Glycin ("G"), Histidin ("H"), Isoleucin

("I"), Leucin ("L"), Lysin ("K"), Methionin ("M"), Phenylalanin ("F"), Prolin ("P"), Serin ("S"), Threonin ("T"), Tryptophan ("W"), Tyrosin ("Y") und Valin ("V"). Der hier verwendete Ausdruck Aminosäure umfaßt auch Analoge der Protein-5 aminosäuren, D-Isomere der Proteinaminosäuren,  $\beta$ -,  $\gamma$ - usw. Aminosäuren, unnatürliche Aminosäuren und ihre Analogen.

Biologisch aktive Substanz bezeichnet jedes Molekül oder Mischung oder Komplex von Molekülen, die *in vitro* und/oder *in vivo* eine biologische Wirkung erzielen, einschließlich Pharmazeutika, Arzneistoffe, Proteine, Steroide, Vitamine, Polyanionen, Nukleoside, Nukleotide, Polynukleotide usw.

In dieser Beschreibung bezeichnete Puffer umfassen: "Hepes", 15 eine N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure, die hier als Puffer bei pH um 7 verwendet wird; "PBS", eine Phosphatpuffersalzlösung mit 10 mM Phosphat und 0,9 Gew.-% NaCl, das hier als isotonischer physiologischer Puffer bei pH 7,4 verwendet wird; "Transfektionspuffer", 10 mM Hepes und 0,9 20 Gew.-% NaCl, das hier als Puffer bei pH um 7,4 verwendet wird; "Tris", Trishydroxymethylaminomethan, das hier ebenfalls als Puffer bei pH um 7 verwendet wird.

Komplexe oder Liposome, die auf Zellen gebracht werden (cell-25 targeted), besitzen weitere Moleküle z. B. auf ihrer Oberfläche, die fähig sind, eine Verbindung auf der Oberfläche der betreffenden Zelle zu erkennen. Zellerkennungsverbindungen umfassen: Liganden für Zelloberflächenrezeptoren, Antikörper für Zelloberflächenantigene usw.

30 Ladungsmaskierte (charge-masked) Komplexe oder Liposomen sind als positiv geladen zu verstehen, die eine Verbindung der Formel I umfassen und ein gebundenes Polymer, das z. B. die Oberfläche des Liposoms bedeckt. Ein Polymer kann kovalent 35 mit einem Lipid verbunden sein, das das Liposom bildet oder auf der Oberfläche adsorbiert sein.

Ein Komplex ist definiert als das durch Mischen zweier oder mehrerer Komponenten hergestellte Produkt. Ein solcher Komplex ist gekennzeichnet durch eine nichtkovalente Wechselwirkung (ionisch, hydrophil, hydrophob usw.) zwischen zwei oder mehr Komponenten.

DNA stellt Desoxyribonukleinsäure dar, die unnatürliche Nukleotide umfassen kann. Die DNA kann einsträngig oder 10 doppelsträngig sein.

Arzneistoff bezeichnet alle prophylaktischen oder therapeutischen Verbindungen, die zur Vorbeugung, Diagnose, Linderung, Behandlung oder Heilung von Krankheiten bei Mensch oder Tier 15 verwendet werden.

Eine Liposomformulierung ist eine Zusammensetzung von Stoffen umfassend ein Liposom, das eingeschlossene Substanz zu diagnostischen, biologischen, therapeutischen oder anderen 20 Verwendungszwecken enthält.

Ein gegebenenfalls vorhandenes Co-Lipid ist als eine Verbindung zu verstehen, die fähig ist, allein oder in Kombination mit anderen Lipidkomponenten ein stabiles Liposom zu bilden. 25 Beispiele der wahlweisen Co-Lipide umfassen phospholipidartige Substanzen wie Lecithin, Phosphatidylcholin, Dioleylphosphatidylcholin (DOPC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin, Phosphatidylglycerin, Phosphatidylinositol, Sphingomyelin, Cephalin, Cardiolipin, Phosphatidsäure, 30 Cerebroside, Dicetylphosphat usw., phosphorfreie Lipide wie Steroide und Terpene. Weitere phosphorfreie Lipide sind z. B. Stearylamin, Dodecylamin, Hexadecylamin, Acetylpalmitat, Glycerinricinoleat, Hexadecylstearat, Isopropylmyristat, Dioctadecylammoniumbromid, amphotere Polymere, Triethanolaminlaurylsulfat, kationische Lipide wie sie zuvor beschrieben wurden und dergleichen Verbindungen.

Ein pharmazeutisch akzeptables Ion ist ein Ion, das selbst nicht toxisch ist.

5 Ein Polyanion ist eine polymere Struktur, wo mehr als eine Einheit des Polymers eine negative Ladung trägt und die Nettoladung des Polymers negativ ist.

Ein Polykation ist eine polymere Struktur, wo mehr als eine  
10 Einheit des Polymers eine positive Ladung trägt und die Nettoladung des Polymers positiv ist.

Ein Polynukleotid ist z. B. DNA oder RNA, die mehr als ein  
Nukleotid enthalten. Polynukleotide sollen auch cyclische  
15 Polynukleotide und unnatürliche Nukleotide umfassen und sie können nach chemischen Verfahren hergestellt werden oder durch Verwendung der Rekombinantentechnik oder durch beides.

Ein Polypeptid ist als eine Reihe von zwei oder mehr Amino-  
20 säuren zu verstehen, die über kovalente Bindung verknüpft sind.

RNA stellt Ribonukleinsäure dar, die auch unnatürliche Nukleotide umfassen kann. Die RNA kann einsträngig oder  
25 doppelsträngig sein.

Bei den bereits beschriebenen Verbindungen gemäß Formel I ist es bevorzugt, wenn Y Carbonyl, d. h. -CO- ist. Damit erfolgt die Verknüpfung nach Art einer Peptidbindung  $-CO-N^{\text{H}}$ .

30 Die Gruppe Z umfaßt bei den Lipidverbindungen gemäß Formel I vorzugsweise eine Esterbindung, d. h. die Gruppe -O-CO-.

Bei weiteren bevorzugten Ausführungsformen sind R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> 35 eine Alkyl- oder Alkenylgruppe mit 10 bis 20, vorzugsweise 12 bis 18 Kohlenstoffatomen. Dabei sind die Reste R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> vor-

zugsweise gleich. Von den beschriebenen bevorzugten Gruppen sind wiederum Alkenylgruppen bevorzugt. Dementsprechend handelt es sich bei den Resten R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> neben Palmityl- oder Stearylgruppen, vorzugsweise um die Oleylgruppe oder um Reste 5 der Linol- oder Linolensäure.

Bei der Formel I ist n vorzugsweise gleich 2. Weiter handelt es sich bei der Gruppe W vorzugsweise um den Seitenkettenrest einer basischen Aminosäure, insbesondere um einen Seitenket-10 tenrest von Lysin oder Ornithin.

Bei den Resten R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> und R<sub>5</sub> kann es sich um Alkylgruppen mit 1 bis 8 Kohlenstoffatomen, insbesondere um die Methylgruppe handeln. Dabei sind die drei Reste R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> und R<sub>5</sub> vorzugsweise 15 gleich. Bei besonders bevorzugten Ausführungsformen sind R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> und R<sub>5</sub> Wasserstoff.

Als Gegenion X können im Prinzip alle denkbaren Anionen verwendet werden, wobei für die meisten Anwendungen der 20 Erfindung pharmazeutisch annehmbare Anionen bevorzugt sind. Vorzugsweise kann es sich bei X um ein Halogenidanion, insbesondere um das Chloridanion handeln.

Bevorzugte Verbindungen gemäß Formel I ergeben sich aus 25 Anspruch 10, auf den hier ausdrücklich Bezug genommen wird. Eine besonders bevorzugte Verbindung ist L-Lysin-bis-(0,0'-cis-9-octadecenoyl-β-hydroxyethyl)amid-dihydrochlorid oder ein optisches Isomer davon.

30 Verbindungen, die unter die Definition der Formel I fallen und erfindungsgemäß bevorzugt sind, lassen sich auch dadurch darstellen, daß man die entsprechenden Verbindungen durch die folgende Verknüpfung darstellt:

Aminosäure  
oder Peptid ----- Dialkanolamin ----- Fettsäure oder  
Fettalkohol

5 Die auf diese Weise darstellbaren Verbindungen sind für die im folgenden noch zu diskutierenden Anwendungen besonders geeignet. Insbesondere zeichnen sie sich durch eine weitaus geringere Toxizität als bisher bekannte Lipidverbindungen, die für ähnliche Anwendungen eingesetzt werden, aus.

10 Neben den beschriebenen Lipidverbindungen umfaßt die Erfindung Komplexe, die mit Hilfe dieser neuen Verbindung herstellbar sind. Dabei soll "Komplex" im Sinne der obigen Definition verstanden werden. Es muß sich nicht notwendiger-  
15 weise um ein vollständig ausgebildetes Liposom handeln. Da allerdings die genauen Mechanismen bei der Komplexbildung nicht bekannt sind, soll der Fall, daß sich aus dem Lipid zunächst Liposome bilden und diese dann mit Polyanionen, Polykationen oder deren Komplexe komplexieren, nach der  
20 Erfindung nicht ausgeschlossen sein.

Die Eigenschaften der erfindungsgemäßen Komplexe sind in den Ansprüchen 12 bis 17 bzw. 18 bis 24 beansprucht und beschrieben. Auf diese Ansprüche wird ausdrücklich Bezug genommen.  
25 Die Komplexbildung ist dabei im wesentlichen darauf zurückzuführen, daß die erfindungsgemäßen Verbindungen positiv geladen sind.

Das Verhältnis zwischen Lipidverbindung und den anderen Bestandteilen des Komplexes, d. h. bei den (binären) Polyanion-Lipid-Komplexen das Verhältnis zwischen Polyanion und Lipidverbindung kann je nach gewünschter Anwendung stark variiert werden. Vorzugsweise ist das Verhältnis zugunsten der Lipidverbindung größer als 1 : 1 (bezüglich der Ladung), so daß  
35 für den Komplex eine positive Gesamt- bzw. Nettoladung resultiert, um auf einfache Weise mit der negativ geladenen Ober-

fläche von biologischen Membranen wechselwirken zu können. Gegebenenfalls wird ein besonders vorteilhaftes Verhältnis experimentell bestimmt. So kann beispielsweise bei einer DNA-Transfektion dasjenige Verhältnis von DNA und Lipidver-  
5 bindung experimentell ermittelt werden, das zu einer optimalen Expression der transfektierten DNA führt.

Grundsätzlich können die erfundungsgemäßen Komplexe mit allen Molekülen ausgeführt werden, die eine negative Ladung aufwei-  
10 sen. Bevorzugt sind solche Komplexe, bei denen ein Polynuk- leotid als Polyanion eingesetzt wird.

Bei den in den Ansprüchen 18 bis 24 dargestellten ternären Komplexen ist es bevorzugt, wenn es sich bei dem Polykation um ein Polypeptid handelt. Grundsätzlich ist es jedoch mög-  
15 lich, auch neutrale Polypeptide zur Bildung ternärer Polynuk- leotid-Polypeptid-Lipid-Komplexe einzusetzen, die ebenfalls von der Erfindung umfaßt sein sollen.

20 Überraschenderweise wurde durch die Ausbildung ternärer Kom- plexe festgestellt, daß beim Einsatz von Polypeptiden bei- spielsweise die Transfektion von Polynukleotiden gegenüber dem Einsatz von Polynukleotid-Lipid-Komplexen weiter be- trächtlich erhöht werden kann. Dabei können die in Anspruch 25 23, auf den hier ausdrücklich Bezug genommen wird, genannten Peptidsequenzen bevorzugt eingesetzt werden. Dabei repräsen- tiert die erste Sequenz den C-terminalen Part des Kernprote- ins des Hepatitis-B-Virus (HBV). Obwohl eine abschließende wissenschaftliche Erklärung zur Zeit noch nicht gegeben wer-  
30 den kann, scheint ein Zusammenhang des positiven Einflusses dieser Peptidsequenzen bei den ternären Komplexen und dem vergleichsweise hohen Anteil an basischen Aminosäuren in den Sequenzen möglich zu sein.

35 Gegebenenfalls können die beschriebenen Komplexe für bestimmte Anwendungen ladungsmaskiert (charge-masked) oder zur Wech-

selwirkung mit bestimmten Zellen oder Zellorganellen ausgebildet (cell-targeted) sein.

Weiter umfaßt die Erfindung die in den Ansprüchen 25 und 26 beschriebenen Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Komplexe. Dabei erfolgt diese Herstellung und das damit verbundene in Kontakt bringen durch übliche Verfahren, die dem Fachmann bekannt sind. So werden beispielsweise zur Herstellung von binären Komplexen Pufferlösungen, die das Polyanion bzw. die Lipidverbindung enthalten, vereinigt. Entsprechendes gilt für die Herstellung von ternären Komplexen, wobei zunächst in einer Pufferlösung ein Polyanion-Polykation-Komplex dargestellt und diese Pufferlösung anschließend mit einer die Lipidverbindung enthaltenden Pufferlösung vereinigt wird.

15 Weiter umfaßt die Erfindung Liposome, die mit mindestens einer erfindungsgemäßen Lipidverbindung herstellbar oder hergestellt sind. Die Herstellung der Liposomen erfolgt dabei in üblicher aus dem Stand der Technik bekannter Weise.

20 Weiter umfaßt die Erfindung Liposom-Formulierungen in wäßriger Lösung, die mindestens eine biologisch aktive Substanz (Stoff, Molekül usw.) und eine Lipidkomponente umfassen. Dabei enthält die Lipidkomponente mindestens eine der erfindungsgemäßen Lipidverbindungen. Neben der biologisch aktiven Substanz und der Lipidkomponente enthält die Liposom-Formulierung übliche Lösungsbestandteile der wäßrigen Lösung, wobei es sich um eine Lösung in reinem Wasser oder vorzugsweise um übliche Pufferlösungen handeln kann.

30 Wie aus der Formulierung von Anspruch 28 hervorgeht, kann als Lipidkomponente eine einzelne Verbindung der Formel I oder ein Gemisch solcher Verbindungen eingesetzt werden. Außerdem ist es möglich, die erfindungsgemäße Verbindung bzw. Verbindungen mit weiteren Co-Lipiden wie sie bereits definiert sind, zum Beispiel PE, POPE in Mischung einzusetzen.

Solange eine Liposombildung möglich ist, ist die Menge an biologisch aktiver Substanz grundsätzlich nicht kritisch. Üblicherweise wird die Substanz in Mengen bis zu 10 Gew.-% in 5 der Liposom-Formulierung vorhanden sein. Als Untergrenze ist beispielsweise ein Wert von 0,01 Gew.-% zu nennen. Ein Mengenbereich von 1 bis 5 Gew.-% an biologisch aktiver Substanz ist bevorzugt.

10 Die erfindungsgemäße Verbindung kann vorzugsweise 1 % bis 100 % der Lipidkomponente ausmachen. Bei bevorzugten Ausführungen der Liposom-Formulierung sind ein oder mehrere Co-Lipide vorhanden, wobei diese Co-Lipide vorzugsweise 30 bis 70 % der Lipidkomponente ausmachen.

15 Handelt es sich bei der biologisch aktiven Substanz um einen Arzneistoff, so wird dessen Menge üblicherweise nach der gewünschten Therapie ausgewählt. Dabei sind vorzugsweise 1 bis 5 Gew.-% des Arzneistoffes in der Liposom-Formulierung vorhanden. Gegebenenfalls können beim Einsatz von Arzneistoffen 20 als biologisch aktiver Substanz pharmazeutisch akzeptable Exzipienten in der Liposom-Formulierung vorhanden sein.

Wie bei den erfindungsgemäßen Komplexen bereits erwähnt, 25 können auch die erfindungsgemäßen Liposomen oder Liposom-Formulierungen gegebenenfalls ladungsmaskiert oder zur Wechselwirkung mit bestimmten Zellen (cell-targeted) ausgebildet sein.

30 Schließlich umfaßt die Erfindung Verfahren zum Transport von Polyanionen oder Polykationen bzw. zum Transport von biologisch aktiven Substanzen allgemein durch biologische Membranen, insbesondere zum Einbringen in Zellen oder Zellorganellen. In diesem Zusammenhang wird ausdrücklich auf die Ansprüche 35 33 bis 38 bzw. 39 bis 42 Bezug genommen. Für die erfindungsgemäßen Verfahren können entweder die erfindungsgemäßen

Verbindungen selbst oder Zusammensetzungen, die solche Verbindungen enthalten, eingesetzt werden.

Bei Durchführung der Verfahren durch Inkubieren *in vivo* können 5 zusätzliche Stabilisatoren wie beispielsweise Polyethylenglykol vorhanden sein.

Weitere Einzelheiten der erfindungsgemäßen Verfahren werden noch beschrieben.

10

Die Verbindungen und andere Teile der vorliegenden Erfindung bringen verschiedene Vorteile. Einer der Vorteile der hier beschriebenen Verbindungen ist, daß sie bis zu 100 % Einschluß von polyanionischen Substanzen mit einem zweckmäßigen 15 Protokoll erlauben. Andererseits führt die Inkubation von positiv geladenen Komplexen mit negativ geladenen Zelloberflächen zu einer schnellen und besseren Aufnahme insbesondere von polyanionischen Substanzen und anderen biologisch aktiven Verbindungen im allgemeinen. Das letztere erlaubt das Einführen 20 von komplexierten bzw. eingeschlossenen polyanionischen Substanzen wie beispielsweise DNA in einem Maße wie es bisher bei diesen Zellen nicht bekannt ist.

Die speziellen Vorteile der hier offenbarten Verbindungen sind wie folgt. Zunächst stellen diese Verbindungen die neuen 25 liposombildenden Lipide dar. Die Geometrie der beiden aliphatischen Ketten in den Verbindungen der Formel I erlaubt ihre Organisation in stabile Doppelschichtstrukturen. Der polare Kopf (z. B. Aminosäure) kann in Abhängigkeit von der Anwendung 30 variiert sein. Dies erlaubt zum Beispiel leicht das Einführen verschiedener Modifikationen an der Aminogruppe, der Seitenkette und der Bindung. Die Zytotoxizität der meisten der hier offenbarten kationischen Verbindungen sind im Vergleich zu den zuvor bei anderen kationischen Amphiphilen 35 richteten günstig. Alle bei den Verbindungen der Formel I dargestellten Bindungen können leicht in der Zelle hydroly-

siert werden, was zur Ausbildung nicht toxischer Verbindungen führt.

Die positiv geladenen Lipide der Formel I besitzen ferner, im 5 Gegensatz zu anderen kationischen Lipiden aus dem Stand der Technik, eine bessere Transfektionseffizienz in Gegenwart von Serum. Die Fähigkeit, Zellen in der ständigen Gegenwart von Serum zu transfektieren ist aus verschiedenen Gründen vor- teilhaft: die Transfektion verläuft leichter und ist weniger 10 zeitaufwendig, die Anforderungen an Medien und Serum sind geringer, den Zellen wird kein Serum entzogen, was Zellfunk- tionen und Lebensfähigkeit beeinträchtigen könnte.

Der zweite spezifische Vorteil der hier offenbarten Technik 15 leitet sich von dem neuen Verfahren zum Einbringen von Polynukleotid (insbesondere DNA) in ternäre Komplexe ab. Dieser Komplex ist insbesondere gebildet aus positiv geladenen Lipi- den der Formel I und einem Komplex aus Polynukleotid und kat- ionischem Polypeptid. Gemäß dem Verfahren wird zuerst der 20 erste Komplex aus Polynukleotid-kationischem Polypeptid gebildet, der im nächsten Schritt mit einem positiv geladenen Lipid der Formel I komplexiert wird. Ein exaktes Abstimmen der Zusammensetzung bestimmt die biologische Aktivität des schließlich erhaltenen Komplexes.

25 Der Vorteil dieser Vorgehensweise gegenüber den aus dem Stand der Technik bekannten Transfektionstechniken liegt beispiels- weise darin, daß die neue Methode zu einer bis zu 300fach höheren Transfektionseffizienz führt. Darüber hinaus kann bei 30 Anwendung der neuen Methode ein Nachweis der Transfektion (z. B. Nachweis des exprimierten Proteins) nach weniger als zwei Stunden nach Beginn der Transfektion leicht registriert wer- den. Außerdem erlaubt das neue Verfahren ein Arbeiten im "Mikromäßstab" zur Transfektion von Zellen (beispielsweise 35 96-Loch-Format), was für das Screening einer großen Zahl von

Proben wünschenswert ist und die Automatisierung des gesamten Verfahrens ermöglicht.

Die Verbindungen der Formel I sind insbesondere nützlich bei  
5 der Herstellung von Liposomen, können aber auch in anderen Fällen verwendet werden, wo kationische Lipide Anwendung finden. Zum Beispiel können sie in industriellen Anwendungen verwendet werden. Von besonderem Interesse ist die Verwendung dieser Verbindungen in Zusammenhang mit kationischen Lipiden,  
10 die für pharmazeutische Formulierungen (Cremes, Pasten, Gele, kolloide Dispersionen und dergleichen) und/oder kosmetische Zusammensetzungen (Makeups, Lippenstifte, Nagellacke, Körperlotionen, Feuchtigkeitscremes, Shampoos und dergleichen) akzeptabel sind.

15

Formulierungen umfassend die Verbindungen der Formel I sind vorteilhaft zur Erzielung einer gewünschten intrazellulären Abgabe von biologisch aktiven Substanzen wie Polynukleotiden, Peptiden, Proteinen, Steroiden und anderen natürlichen oder  
20 synthetischen Verbindungen. Die intrazelluläre Abgabe kann in das Zytosol, in den Kern oder beides erfolgen. Eine solche intrazelluläre Abgabe kann in Gewebekulturen (in vitro) erreicht werden und kann beispielsweise verwendet werden, um Zellen mit gewünschten Polynukleotiden (z. B. DNA) zu trans-  
25 fektieren oder um Proteine oder dergleichen abzugeben.

Formulierungen umfassend die Verbindungen der Formel I können auch zur Therapie ex vivo verwendet werden, wo aus den Organismus isolierte Zellen in vitro transfektiert werden und  
30 dann in den Organismus implantiert werden. Ein Beispiel für diese Anwendung ist das Transfektieren von Knochenmarkszellen.

Eine intrazelluläre Abgabe kann auch im ganzen Organismus (in  
35 vivo) erreicht werden und kann daher bei verschiedenen Anwendungen nützlich sein wie Gentherapie, Antisensibilisierungs-

und Antigentherapie. Intrazelluläre Abgabe in vivo kann auch zur DNA-Impfung verwendet werden mit dem Ziel, eine Immunreaktion (humoral und/oder zellulär) auf das gewünschte Protein zu induzieren.

5

Intrazelluläre Abgabe unter Verwendung der Verbindungen der Formel I kann auch nützlich sein zur Abgabe von Antikrebs- und Antivirusverbindungen, Antibiotika und dergleichen.

- 10 Eine Zellselektivität kann erreicht werden durch Einbringen von Zellerkennungsverbindungen, z. B. auf der Oberfläche des Vesikels wie Antikörper, Liganden für Zelloberflächenrezeptoren und dergleichen. Eine erhöhte Stabilität und weitere Selektivität kann erreicht werden, z. B. durch Überziehen des
- 15 Liposomvesikels mit einer geeigneten ladungsmaskierten natürlichen oder synthetischen Verbindung wie Polymeren und neutralen oder negativ geladenen Lipiden.

Liposomvesikel umfassend Verbindungen der Formel I können zur

- 20 Auslösung einer spezifischen Immunreaktion auf ein bestimmtes Antigen verwendet werden, das in das Liposom eingebracht ist. Weitere Komponenten wie N-Palmitoyl-S-(2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl)-R-cystein (Pam<sub>3</sub>Cys) oder N-Acetyl-myramyl-L-threonyl-D-isoglutamin (MDP) und Derivate davon können
- 25 besonders nützlich sein.

Verbindungen der Formel I sind von Interesse für die Einführung einer lipophilen Gruppe in Polymere und insbesondere in Peptide, um ihre Aufnahme durch eine Zelle zu erhöhen oder

- 30 um ihre Inkorporation in die lipidhaltigen Vesikel und dergleichen zu erhöhen. Aktivierte Verbindungen der Formel I können auch zur Modifizierung von Proteinen verwendet werden.

Weitere Einzelheiten der bisher vorgestellten Teile der

- 35 Erfindung ergeben sich durch die folgende Beschreibung von Herstellungsverfahren, Lipidverbindungen und Beispielen für

deren Verwendung. Auf die beigefügten Figuren wird jeweils bei der Beschreibung des jeweiligen Beispiels verwiesen.

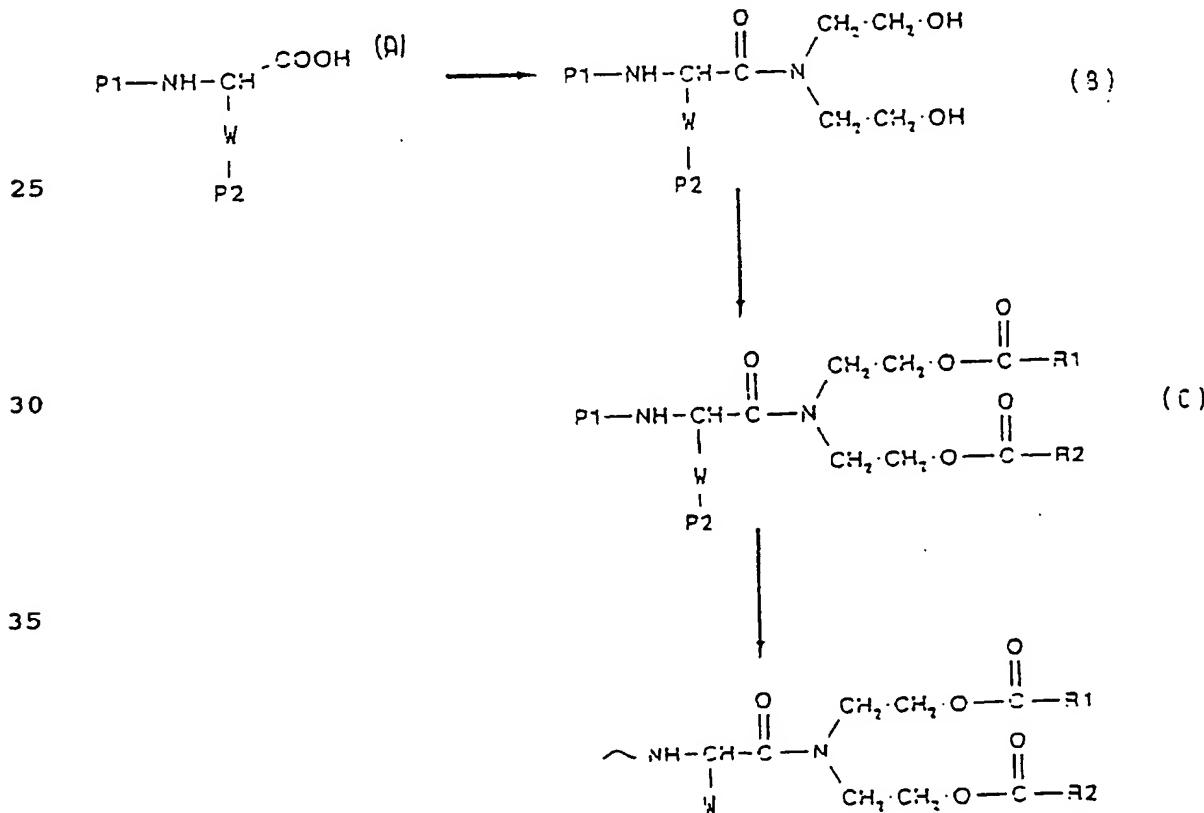
5

**Verfahren zur Darstellung ausgewählter Verbindungen der Formel I**

10 Unter Verwendung bekannter Techniken kann der Fachmann die hier angegebenen bevorzugten Polypeptidaminosäuresequenzen leicht durch Zusätze, Elimination oder Substitution, Erhöhung oder Verringerung abwandeln oder einfach eine andere Sequenzkodierung für verschiedene kationische Polypeptide verwenden.

15 Es ist jedoch anzumerken, daß solche Variationen im Rahmen dieser Erfindung liegen. Es ist ferner anzumerken, daß die nachfolgend angeführten Beispiele nur zum Zwecke der Erläuterung angegeben sind und nicht als Einschränkung dieser Erfindung in irgendeiner Weise zu verstehen sind.

20



Dieses Reaktionsschema ist für die Synthese von bevorzugten Verbindungen der Formel I anwendbar, worin Z eine Esterbindung und n gleich 2 ist. In diesem Reaktionsschema sind P<sup>1</sup> und P<sup>2</sup> Schutzgruppen und sie sind gleich oder unterschiedlich, W ist eine Seitenkette einer Aminosäure, R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> sind gleich und sind Alkyl oder Alkenyl mit 6 bis 24 Kohlenstoff-atomem.

Verbindungen der Formel (A) sind im Handel in optisch reiner Form erhältlich. Zur Bildung der Verbindungen der Formel (B) wird die Carboxylgruppe der Aminosäure der Formel (A) mit einem geeigneten Reagens aktiviert und dann mit der Iminogruppe von Diethanolamin umgesetzt. Verfahren zur Aktivierung von Aminosäuren sind im Stand der Technik bekannt. Beispielsweise kann das Verfahren mit Dicyclohexylcarbodiimid/N-Hydroxysuccinimid zur epimerisierungsfreien Amidierung geschützter Aminosäuren angewendet werden.

Das Amid der Formel (B) wird durch Auflösen der Aminosäure von Formel (A) und einem zuvor gebildeten Salz von N-Hydroxysuccinimid und Diethanolamin in einem geeigneten polaren Lösungsmittel wie Dimethylformamid hergestellt. Die Mischung wird auf 0 °C gekühlt und dann eine Lösung von Dicyclohexylcarbodiimid zugegeben. Die Umsetzung wird durch Rühren der Lösung eine Stunde lang bei 0 °C und acht Stunden lang bei Raumtemperatur durchgeführt. Das erhaltene Amid der Formel (B) wird dann nach üblichen Abtrennverfahren gewonnen.

Um die Bildung der Verbindungen der Formel (C) zu erreichen, wird das Amid der Formel (B) in einem geeigneten Lösemittel (z. B. Dichlormethan) aufgelöst. Dazu wird ein geeignetes tertiäres Amin wie beispielsweise Triethylamin in molarem Überschuß zugegeben. Die Mischung wird auf ungefähr 0 °C gekühlt. Das Alkylierungsmittel mit gewünschter Kettenlänge und ungesättigten Gruppen wird in einem molaren Überschuß zugegeben, bevorzugt in ungefähr der 3- bis 4fachen Menge des

Amids der Formel (B). Es kann beispielsweise Oleoylchlorid verwendet werden, um die Addition von 9-Octadecenoylgruppen zu erreichen. Diese Mischung wird dann ungefähr 3 Stunden unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird das

5 Produkt der Formel (C) extrahiert.

Die Verbindung der Formel (C) wird dann in geeigneter Weise von ihren Schutzgruppen befreit, wobei die Verfahrensweise von den verwendeten Schutzgruppen abhängt, extrahiert und  
10 durch Chromatographie gereinigt.

#### Beispiel 1

Herstellung von L-Lysin-bis-(O,O'-oleoyl-β-hydroxyethyl)amid-  
15 dihydrochlorid (1)

Boc-Lys(Boc)-OH \*DCHA (2,63 g, 5 mmol) werden in Ethylacetat suspendiert und unter Verwendung von eiskalter 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in die freie Säure überführt. Boc-Lys(Boc)-OH in Ethylacetat  
20 wird mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und zur Trockene verdampft. Das verbliebene Öl wird in ungefähr 15 ml Dimethylformamid (DMF) suspendiert, das 1,1 g (5 mmol) eines zuvor gebildeten Salzes von N-Hydroxysuccinimid und Diethanolamin (HOSu\*N(EtOH)<sub>2</sub>) enthält, und wird mit Eiswasser auf 0 °C gekühlt. Unter Rüh-  
25 ren wird eine Lösung von 1,13 g (5,5 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in 5 ml DMF der Mischung zugegeben, die eine Stunde bei 0 °C gerührt wird und dann nochmals 8 Stunden bei Raumtemperatur. Die Mischung wird im Vakuum zur Trockene konzentriert. Nach Zugabe von ungefähr 50 ml Ethylacetat zum  
30 Rückstand fällt der größte Teil des Dicyclohexylharnstoffes (DCU) aus und wird abfiltriert. Die Ethylacetatphase wird mit wässrigen Lösungen von NaHCO<sub>3</sub> (5 %) und Citronensäure (5%) in 0,1 M NaCl gewaschen, mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und zur Trockene eingedampft, so daß 1,7 g des Rohprodukts als farbloses Öl  
35 erhalten werden.

Eine Lösung von 1,7 g (3,92 mmol) Boc-Lys(Boc)-N(EtOH)<sub>2</sub>, 1,64 ml Triethylamin und 3,93 ml Oleoylchlorid (jeweils 11,7 mmol) in 50 ml Dichlormethan (DCM) werden 30 min lang bei 0 °C und 4 Stunden unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre im dunkeln bei Raumtemperatur 5 gerührt. Die Mischung wird mit Methanol abgeschreckt, im Vakuum konzentriert, in Hexan aufgelöst und dreimal mit 0,1 M KOH in Methanol/Wasser (1 : 1 Vol.) bei 0 °C, dann einmal mit 0,1 M wäßriger NaCl gewaschen. Die Hexanphase wird im Vakuum konzentriert und der Rückstand mit 50 ml einer Mischung aus 10 Trifluoressigsäure (TFA)/DCM (1 : 1 Vol.) 40 min bei Raumtemperatur behandelt. Die Mischung wird wiederholt mit Toluol gemischt und im Vakuum aufkonzentriert und dann in Chloroform auf eine Säule mit Silica Gel 60 aufgegeben. Die Säule wird mit einem aufsteigenden Gradienten von Methanol in Chloroform 15 eluiert und die reine Verbindung (2,3 g, 62 % Ausbeute) bei ungefähr 20 % Methanol eluiert. Das Hydrochlorid wird durch Auflösen des Produktes in trockenem Ethylacetat, das mit HCl-Gas gesättigt ist, und Eindampfen zur Trockene hergestellt. (Analyse: ES-MS: bestimmte Molmasse 762 (berechnet 20 762); TLC: R<sub>f</sub> = 0,69 in Ethylacetat:Essigsäure:Wasser = (4:1:1); HPLC: R<sub>t</sub> = 14,19 min, Säule Nucleosil C2 4,0x100 mm, Gradient 30 - 90 % Acetonitril in 0,1 % TFA in Wasser in 20 min).

25 In gleicher Weise, aber durch Substitution des geeigneten Ausgangsmaterials werden die folgenden Verbindungen hergestellt:

L-Lysin-bis-(O,O'-palmitoyl-β-hydroxyethyl)amid-dihydro-  
30 chlorid (2)  
L-Lysin-bis-(O,O'-myristoyl-β-hydroxyethyl)amid-dihydro-  
chlorid (3)  
L-Ornithin-bis-(O,O'-myristoyl-β-hydroxyethyl)amid-dihydro-  
chlorid (4)  
35 L-Ornithin-bis-(O,O'-oleoyl-β-hydroxyethyl)amid-dihydro-  
chlorid (5)

L-Ornithin-bis-(O,O'-palmitoyl-β-hydroxyethyl)amid-dihydrochlorid (6)  
L-Arginin-bis-(O,O'-oleoyl-β-hydroxyethyl)amid-dihydrochlorid (7)  
5 L-Arginin-bis-(O,O'-palmitoyl-β-hydroxyethyl)amid-dihydrochlorid (8)  
L-Serin-bis-(O,O'-oleoyl-β-hydroxyethyl)amid-dihydrochlorid (9)  
Glycin-bis-(O,O'-palmitoyl-β-hydroxyethyl)amid-dihydrochlorid  
10 (10)  
Sarcosin-bis-(O,O'-palmitoyl-β-hydroxyethyl)amid-dihydrochlorid (11)  
L-Histidin-bis-(O,O'-palmitoyl-β-hydroxyethyl)amid-dihydrochlorid (12)  
15 L-Glutamin-bis-(O,O'-palmitoyl-β-hydroxyethyl)amid-dihydrochlorid (13).

Beispiel 2

20 Synthese von N-~~α~~-tert-Butoxycarbonyl-L-Asparaginsäure-~~α~~-N'-bis-(O,O'-palmitoyl-β-hydroxyethyl)amid (Boc-Asp-N(EtOPalm)<sub>2</sub> (14)) und N-~~α~~-Fluorenylmethyloxycarbonyl-L-Asparaginsäure-~~α~~-N'-bis-(O,O'-palmitoyl-β-hydroxyethyl)amid (Fmoc-Asp-N(EtOPalm)<sub>2</sub> (15))  
25  
Die Verbindung Boc-Asp(OBzl)-N(EtOH)<sub>2</sub> wird auf dieselbe Weise hergestellt wie oben für die Herstellung der Verbindung Boc-Lys(Boc)-N(EtOH)<sub>2</sub> beschrieben. Die Verbindung Boc-Asp(OBzl)-N(EtOPalm)<sub>2</sub> wird mit wenigen Modifikationen in derselben  
30 Weise hergestellt wie die Verbindung Boc-Lys(Boc)-N(EtOOL)<sub>2</sub>. Die Reaktion läuft über Nacht, die Mischung wird mit Ethylacetat verdünnt und dann in eine gesättigte Lösung von NaHCO<sub>3</sub> gegossen, um restliches Palmitoylchlorid zu zerstören und Natriumpalmitat auszufällen. Der Niederschlag wird abfiltriert und die organische Phase zur Trockene evakuiert und in  
35 heißem Methanol aufgelöst. Das Produkt wird in kaltem Methan-

nol ausgefällt und durch Filtration in einer Ausbeute von 55 % gewonnen (TLC:  $R_f = 0,64$  in Chloroform : Methanol = 100 : 2). Die Benzylschutzgruppe wird vom Produkt (1,5 g) durch Behandeln mit  $NH_4COOH$  (0,65 g) in Gegenwart von frischem Pd-Schwarz (ungefähr 0,1 g) in 15 ml DMF über Nacht entfernt. 5 Pd-Schwarz wird abfiltriert und die Mischung im Vakuum verdampft. Der Rückstand wird aus Methanol/Wasser ausgefällt, so daß das gewünschte Produkt Boc-Asp-N(EtOPalm)<sub>2</sub> (14) in einer Ausbeute von 85 % erhalten wird. (Analyse: ES-MS: bestimmte 10 Molmasse 796,5 (berechnet 796); TLC:  $R_f = 0,4$  in Chloroform : Ethylacetat : Methanol = 9 : 3 : 1).

0,5 g (0,62 mmol) Boc-Asp-N(EtOPalm)<sub>2</sub> werden mit einer Mischung von TFA/DCM = 1 : 1 30 min lang bei Raumtemperatur 15 behandelt. Die Mischung wird wiederholt mit Toluol verdampft. Der Rückstand wird in 10 ml DMF aufgelöst, mit Diisopropyl-ethylamin (DIPEA) neutralisiert und zwei Stunden lang mit 1,2 Äquivalenten 9-Fluorenylmethyloxycarbonylcarbonat (Fmoc-OSu) umgesetzt. Die Reaktionsmischung wird verdampft und in Methanol wieder aufgenommen. Die gewünschte Verbindung Fmoc-Asp-N(EtOPalm)<sub>2</sub> (15) wird ausgefällt, so daß 0,44 g der Verbindung 20 in einer Ausbeute von 77 % erhalten werden (Analyse: TLC:  $R_f = 0,4$  in Chloroform:Ethylacetat:Methanol = 9:3:1).

25 Unter Verwendung ähnlicher Verfahrensweisen, aber Substitution des geeigneten Ausgangsmaterials, können die folgenden Verbindungen hergestellt werden:

N- $\alpha$ -tert-Butoxycarbonyl-L-glutaminsäure- $\gamma$ -N'-bis-(O,O'-30 palmitoyl- $\beta$ -hydroxyethyl)amid Boc-Glu(N(EtOPalm)<sub>2</sub>)-OH (16)  
N- $\alpha$ -Fluorenylmethyloxycarbonyl-L-glutaminsäure- $\gamma$ -N'-bis-(O,O'-palmitoyl- $\beta$ -hydroxyethyl)amid Fmoc-Glu(N(EtOPalm)<sub>2</sub>)-OH (17)  
N- $\alpha$ -tert-Butoxycarbonyl-L-asparaginsäure- $\beta$ -N'-bis-(O,O'-35 palmitoyl- $\beta$ -hydroxyethyl)amid Boc-Asp(N(EtOPalm)<sub>2</sub>)-OH (18)

Außerdem können die Zwischenprodukte ihrer Synthese oder der oben beschriebenen Synthese zur Herstellung von Liposomen verwendet werden:

- 5 L-Glutaminsäure- $\gamma$ -N'-bis-(0,0'-palmitoyl- $\beta$ -hydroxyethyl)amid  
H-Glu(N(EtOPalm)<sub>2</sub>)-OH (19)
- 10 L-Asparaginsäure- $\beta$ -N'-bis-(0,0'-palmitoyl- $\beta$ -hydroxyethyl)amid  
H-Asp(N(EtOPalm)<sub>2</sub>)-OH (20)
- 15 L-Asparaginsäure- $\alpha$ -N'-bis-(0,0'-palmitoyl- $\beta$ -hydroxyethyl)amid  
H-Asp(N(EtOPalm)<sub>2</sub>) (21)

**Herstellung und Eigenschaften eines Komplexes aus DNA und Verbindung (1)**

15

**Beispiel 3**

Fluoreszenz-Untersuchungen. Fluoreszenzmessungen werden mit einem Aminco SPF-1000Sc Spektrophotometer durchgeführt, wobei 20 eine 1 cm Lichtwegzelle mit einer Schlitzweite zur Anregung und Emission von 10 nm verwendet werden. Die Bindung von (1) an Nukleinsäuren wird aus der Verdrängung des Ethidiumbromids abgeleitet, das bei Einfügung zwischen die DNA-Basenpaare als Fluoreszenzsonde wirkt. Die Fluoreszenz wird unmittelbar nach der Zugabe steigender Mengen von (1) zu mit 25 Ethidiumbromid (5  $\mu$ g/ml Kalbsthymus-DNA,  $8 \times 10^{-6}$  M bp (base pairs); Ethidiumbromid 1 : 50 bp in 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7,4) komplexierter DNA gemessen. Die Ethidiumbromidverdrängung wird durch die Abnahme der Ethidiumbromidfluoreszenz 30 (Anregung = 540 nm, Emission = 600 nm) verfolgt, die auftritt, wenn es von der DNA freigesetzt wird (Fig. 1). Die Fluoreszenzintensität nimmt mit zunehmender Konzentration des kationischen Lipids graduell ab. Dies zeigt, daß Kompaktierung und/oder Aggregation der DNA eintritt. Das Verhältnis 35 zwischen (1) und DNA, bei dem die Fluoreszenzlösung sich nicht mehr ändert, entspricht ungefähr 6 : 1 (Gew./Gew.). Das

erhaltene Verhältnis entspricht einem Ladungsverhältnis von ungefähr 3,5 : 1.

### **Transfektion von Zellen**

5

#### **Beispiel 4**

##### **Zellkulturen und Plasmide**

HeLa (CCL2, humanes Epithelkarizom), COS-7 (CRL 1651, Niere,  
10 SV-40 transformiert, Afrikanischer grüner Affe), HT-29 (HTB  
38, humanes KOLON-Adenokarzinom), CV-1 (CCL 70, Niere,  
Afrikanischer grüner Affe), 818-4 (humanes Pankreas-Adenokar-  
zinom), H4IIE (CRL 1548, Hepatom, Ratte), K562 (CCL 243,  
humane chronische myelogene Leukämie), HL-60 (CCL 240, humane  
15 promyelotische Leukämie) werden in 5 % CO<sub>2</sub> bei 37 °C auf  
Kunststoffgewebezellkulturflaschen in RPMI 1640 oder DMEM mit  
10 % fetalem Kalbsserum und versehen mit Penicillin zu 100  
Einheiten pro ml, Streptomycin zu 100 µg pro ml, 2 mM Glut-  
amin und 0,1 µM Dexamethason für H4IIE-Zellen gezüchtet.

20

Die Plasmide pCMVL und pCMVβ-gal kodieren Luciferase- bzw. β-  
Galactosidasegene und ihre Expression steht unter der Kon-  
trolle des Promoters des Cytomegalovirus (CMV). Die Plasmide  
pZeoSV und pZeoSVLacZ kodieren das Sh-Ble-resistente Protein  
25 für Zeocin (eingetragenes Warenzeichen), das eine Selektion  
sowohl in prokaryotische wie in eukaryotische Zellen erlaubt.  
Die eukaryotische Expression steht unter der Kontrolle des  
Promoters von CMV. pZeoSVLacZ kodiert außerdem das β-Galacto-  
sidasegen unter Kontrolle des Verstärkerpromoters von SV40.  
30 Plasmid-DNA wird auf QIAGEN-Säulen (eingetragenes Warenzei-  
chen) unter Verwendung des QIAGEN-Plasmidreinigungsverfah-  
rens (eingetragenes Warenzeichen) gereinigt.

Transfektion von Gewebekulturzellen. Herstellung der Zellen,  
35 Transfektionsprotokoll und Untersuchungen zur Transfektions-

effizienz. Die einzelnen Transfektionen sind im Ergebnisteil ausführlich angegeben.

a) Anhaftende Zellen. Ungefähr 24 Stunden vor einer Transfektion werden fast confluente Zellmonoschichten trypsinisiert. Die Zellen werden erneut in frischem Medium suspendiert und entweder in 24-Lochplatten ( $5 \times 10^4$  Zellen pro Probenvertiefung) oder in 6-Lochplatten ( $2-2,5 \times 10^4$  Zellen pro Probenvertiefung) eingebracht. Unmittelbar vor der Transfektion werden die Zellen in frisches Medium mit oder ohne 10 % FCS gebracht. Im allgemeinen werden die Zellen bei 50 - 70 % Confluenz transfektiert. 24 Stunden nach der Transfektion werden die Zellen mit 2 ml PBS dreimal gewaschen und in 100  $\mu$ l (24-Lochplatten) oder 200  $\mu$ l (6-Lochplatten) Lysispuffer (77 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 23 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 % Triton X-100, 1 mM Dithio-treitol, pH 7,8) lysiert. Zellrückstände werden durch Zentrifugieren entfernt (14000 Upm 2 min lang). Üblicherweise wird die Enzymaktivität (siehe unten) direkt nach der Zellysis bestimmt. Die Lysate können jedoch bei -20 °C gelagert werden, ohne ihre Aktivität zu verlieren.

b) Suspensionszellen. 24 Stunden vor einer Transfektion werden die Zellen in frisches vollständiges Wachstumsmedium eingebracht. Unmittelbar vor der Transfektion werden die Zellen aufgenommen, erneut in frischem Medium mit oder ohne 10 % FCS bei  $0,25 \times 10^6$  Zellen pro ml suspendiert und in 24-Lochplatten mit 2 ml pro Probenvertiefung eingebracht.

Die Zellen werden normalerweise 24 Stunden nach der Transfektion geerntet (die Erntezeit ist eine wichtige Größe und sollte optimiert werden), durch Zentrifugieren abgetrennt und in 10 ml PBS suspendiert, wiederum zentrifugiert und die Zellen in ein Eppendorfröhrchen von 1,5 ml mit 1 ml PBS übertragen. Die Zellen werden in der Eppendorfzentrifuge zentrifugiert (14000 Upm 20 s lang). Die erhaltenen Zellen werden in 100  $\mu$ l Lysispuffer (oben beschrieben) lysiert. Die Probe

wird dann zentrifugiert (14000 Upm 2 min lang) und der Überstand sorgfältig in eine frisches Zentrifugierröhrchen übertragen.

5 c) Transfektionsprotokolle

Transfektion von Zellen unter Verwendung von Verbindung (1). Plasmid-DNA (aus einer Stamm-Lösung mit einer Konzentration von etwa 1 mg/ml) und kationisches Lipid (aus einer Stamm-Lösung mit einer Konzentration von 1 - 2 mg/ml) werden 10 getrennt verdünnt in Eppendorfröhrchen von 1,5 ml mit 10 mM Hepes, 0,9 % NaCl-Puffer, pH 7,4 auf ein Endvolumen von 100 µl. Bei typischen Transfektionen schwankt die Menge an DNA von 1 bis 2 µg pro 100 µl. Die Menge eines kationischen Lipids schwankt von 0 bis 20 µg pro 100 µl. Zwei Lösungen 15 werden zusammengemischt, so daß sich eine DNA-Lipid-Lösung bildet. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wird die erhaltene DNA-Lipid-Lösung den Zellkulturen zugegeben, wie zuvor kultiviert und vorsichtig vermischt. Alternativ kann die DNA-Lipid-Lösung mit 800 µl (für 24- oder 6-Lochplatten) 20 des geeigneten Mediums (+/- FCS) verdünnt und gemischt werden. Die verdünnte Lösung wird den Zellen überschichtet und mit dem geeigneten Medium gespült. Die Komplexe werden mit den Zellen 1 - 24 Stunden lang inkubiert. Eine typische Inkubationszeit in Abwesenheit von Serum beträgt 4 Stunden. Das 25 Transfektionsmedium wird dann gegen ein vollständiges Wachstumsmedium ersetzt. In Gegenwart von Serum wird das Transfektionsmedium üblicherweise nicht ersetzt und die Zellen wachsen weiter in Gegenwart von Komplexen bis zum Ende der Versuche (einstufige Transfektion). Nach 24 Stunden werden 30 die Zellen aufgearbeitet wie es oben beschrieben ist.

Transfektion von Zellen unter Verwendung von ternären Komplexen mit (1)

Plasmid-DNA wird mit 10 mM Hepes, 0,9 % NaCl-Puffer (pH 7,4), 35 der das geeignete Peptid (beispielsweise gemäß Anspruch 23) enthält, auf ein Endvolumen von 100 µl verdünnt. Die Menge an

Peptid schwankte von 0 bis 20  $\mu$ g pro 100  $\mu$ l Puffer. Eine typische Konzentration ist 2 - 5  $\mu$ g Peptid pro 100  $\mu$ l Puffer. Nach 10 min Inkubation wird die erhaltene Lösung mit 100  $\mu$ l einer kationischen Lipidlösung gemischt und die ganze Vorge-  
5 hensweise wie oben beschrieben fortgeführt.

d) Enzymassays

Luciferase-Assay. Die Luciferaseaktivität in Zellextrakten wird unter Verwendung eines Berthold Lumat-Gerätes (LB 9501)  
10 durchgeführt. Der Luziferase-Assay wird durch Zugabe von 5 - 10  $\mu$ l Zellextrakt durchgeführt. Die Probe wird in das LB 9501 eingebracht und das Gerät spritzt automatisch 100  $\mu$ l Injektionspuffer (20 mM Tricin, 1,07 mM  $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg(OH)}_2$ , 2,67 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1 mM EDTA, 33,3 mM DTT, 270  $\mu$ M Coenzym A, 470  $\mu$ M 15 Luciferin, 530  $\mu$ M ATP, pH 7,8) in die Probe, mißt Lichtemission und zeigt sie als integrierten Wert für die ersten 10 Sekunden der Lichterzeugung.

$\beta$ -Galactosidase-Assay. Die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität in Zell-  
20 extrakten wird auf 96-Loch-Mikrotiterplatten gemessen. 10  $\mu$ l Zellextrakte werden mit 70  $\mu$ l " $\beta$ -Gal"-Puffer (33 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 66 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 40 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) und 25  $\mu$ l ONPG-Lösung ( $\alpha$ -Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid 4 mg/ml in "  $\beta$ -Gal"-Puffer) verdünnt. Die Mischung wird 30 Minuten bis 1 25 Stunde lang auf 37 °C gehalten und die Reaktion durch Zusatz von 150  $\mu$ l 1M Natriumbicarbonat gestoppt. Die Absorption wird bei 405 nm gemessen.

Anfärben von Zellen mit 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galacto-  
30 pyranosid (X-Gal). Die gespülten Zellen werden mit 1 %iger Glutaraldehydlösung in 0,1 M Natriumphosphat, 1 mM MgCl<sub>2</sub>-Puffer (pH 7,0) 15 min lang bei Raumtemperatur fixiert. Die Fixierlösung wird entfernt, die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und Anfärbelösung (0,2 % X-Gal, 10 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 3,3 mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> und 3,3 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, pH 7,0) auf die Zellen überschichtet und 1 bis 8

Stunden bei 37 °C inkubiert. Die angefärbten Zellen auf Kulturplatten oder Objektträgern werden unter Verwendung von Inversions- bzw. Phasenkontrastmikroskopen sichtbar gemacht.

5 Proteinbestimmung. Der Proteingehalt im Überstand wird unter Verwendung der Technik von Lowry (Bio-Rad-Proteinbestimmungs-kit) untersucht.

Die Bestimmung der Zytotoxizität wird unter Verwendung des  
10 MTT-Assays (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) durchgeführt.

#### Ergebnisse

15 Anhaftende Zellen.

a) Verbindung (1). Die Transfektionseffizienz von Verbindung (1) auf HeLa-Zellen in Gegenwart oder Abwesenheit von Serum wird mit DOTAP verglichen.  $5 \times 10^4$  Zellen pro Probenvertiefung (24-Lochplatte) in 1 ml vollständigem RPMI 1640 werden einen 20 Tag vor der Transfektion aufgebracht. Unmittelbar vor der Transfektion wird das Medium entfernt und die Zellen mit 1 ml frischem Medium mit oder ohne Serum versorgt. Zur Bestimmung des optimalen Verhältnisses von kationischen Lipiden zu DNA werden verschiedene Mengen beider Lipide im Transfektionspuffer (Endvolumen 100  $\mu$ l) mit 100  $\mu$ l DNA-Lösung gemischt, die 1  $\mu$ g pCMVL enthält. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur werden 100  $\mu$ l dieser Mischung, die 0,5  $\mu$ g des Plasmids und die Hälfte der angegebenen Menge des Lipids enthält, zu jeder Probe zugegeben. In Gegenwart von Serum werden 25 die Platten 24 Stunden inkubiert, ohne das Medium zu wechseln. In Abwesenheit von Serum wird das Transfektionsmedium nach 4 Stunden entfernt und die Zellen werden mit 1 ml frischem mit Serum versetztem Medium versehen.

30 35 Die Zellen werden 24 Stunden nach der Transfektion für den Luciferase-Assay geerntet wie es oben beschrieben ist. Die

Ergebnisse sind in Fig. 2 als Gesamtmenge eines kationischen Lipids pro 1  $\mu$ g pCMVL angegeben. In dem Fall, wo Zellen in Gegenwart von Serum transfektiert werden, wird die optimale Expression der Luciferaseaktivität unter Verwendung eines 5 Verhältnisses von DOTAP/DNA von 10 : 1 (Gew./Gew.) bzw. einem Verhältnis von Verbindung (1)/DNA von 5 : 1 (Gew./Gew.) erhalten. In Abwesenheit von Serum wird die optimale Expression der Luciferaseaktivität bei beiden Lipiden unter Verwendung eines Verhältnisses von Lipid/DNA von 5 : 1 (Gew./Gew.) erhalten. 10 Die Transfektion unter Vermittlung von Verbindung (1) ist im Vergleich zur DOTAP-Transfektion in Gegenwart von Serum 12mal bzw. in Abwesenheit von Serum 6mal höher.

b) Ternärer Komplex mit Verbindung (1).  $5 \times 10^4$  Zellen pro 15 Probenvertiefung in 1 ml vollständigem RPMI 1640 werden einen Tag vor der Transfektion aufgebracht. Unmittelbar vor der Transfektion wird das Medium entfernt und die Zellen mit 1 ml frischem Medium mit oder ohne Serum versehen. Zur Bestimmung des Einflusses von HBV-Peptid auf die Transfektion von HeLa- 20 Zellen werden verschiedene Mengen des Peptids mit 1  $\mu$ g pCMVL gemischt, so daß sich ein Endvolumen von 100  $\mu$ l ergibt und 10 min inkubiert. Dann werden 100  $\mu$ l einer Lösung, die 7,5  $\mu$ l Verbindung (1) enthält, durch Mischen zugegeben. Nach weiteren 10 min Inkubation werden 100  $\mu$ l der Transfektionslösung 25 (enthält 0,5  $\mu$ g DNA und 3,75  $\mu$ g Verbindung (1)) auf die Zellen aufgebracht. Nach 4 Stunden wird das Transfektionsmedium gegen 1 ml frisches vollständiges Wachstumsmedium ersetzt.

24 Stunden nach der Transfektion werden die Zellen lysiert 30 und die Zellextrakte auf die Genexpression analysiert wie es oben beschrieben ist. Die Transfektionsgrade (mit Transfektion in Gegenwart von Serum) sind in Fig. 3 als Prozentsatz des mit DOTAP erhaltenen Wertes angegeben. Die Ergebnisse zeigen, daß die optimale Menge an Peptid in diesem Experiment 35 5  $\mu$ g beträgt und die Expression der Luciferaseaktivität 14mal höher ist als die bei Transfektionen mit Verbindung (1) bzw.

20mal höher als mit DOTAP. Im Falle der Transfektion unter serumfreien Bedingungen ist die optimale Menge des Peptids gleich und die Expression der Luciferaseaktivität ungefähr 10mal höher als bei Transfektionen mit Verbindung (1) bzw. 5 150mal höher als mit DOTAP (Daten nicht angegeben).

c) Zeitabhängigkeit.  $5 \times 10^4$  HeLa-Zellen pro Probenvertiefung (24-Lochplatte) in 1 ml vollständigem RPMI 1640 werden einen Tag vor der Transfektion aufgebracht. Unmittelbar vor der 10 Transfektion wird das Medium entfernt und die Zellen mit 1 ml frischem Medium mit Serum versehen. 50  $\mu$ l der Transfektionslösung, die 0,25  $\mu$ g pCMVLuc, 0,5  $\mu$ g HBV-Peptid und 1,87  $\mu$ g Verbindung (1) enthält, werden jeder Probenvertiefung unter Mischen zugegeben. Nach 2 Stunden wird das Transfektionsmedium durch 1 ml frisches vollständiges Wachstumsmedium 15 ersetzt. Die Zellen werden zur angegebenen Zeit für das Luciferase-Assay geerntet wie es oben beschrieben ist. Die Luciferaseaktivität nimmt rasch zu, wobei sie ein Maximum nach 12 - 16 Stunden erreicht. Schon nach 2 Stunden werden  $4,5 \times 10^4$  20 Lichteinheiten erhalten. Dieselbe Luciferaseaktivität wird nach 3 Stunden mit Transfektion unter Vermittlung von Verbindung (1) und erst nach 5 - 6 Stunden bei Transfektion unter Vermittlung von DOTAP erhalten.

25 Suspensionszellen.

a) Verbindung (1). Die Transfektionseffizienz von Verbindung (1) auf K562-Zellen in Gegenwart von Serum wird mit DOTAP verglichen. Zur Bestimmung des optimalen Verhältnisses zwischen kationischen Lipiden und DNA werden verschiedene Mengen 30 der beiden Lipide einer bestimmten Menge von pCMVL (1  $\mu$ g pro Probenvertiefung oder pro  $0,5 \times 10^6$  Zellen in 2 ml des vollständigen RPMI 1640, 24-Lochplatten) zugegeben. Jeder Probenvertiefung werden 200  $\mu$ l der Transfektionsmischung zugegeben und die Platte 24 h bei 37 °C inkubiert (einstufige Transfektion). Die Zellen werden lysiert, wie es oben beschrieben ist. Die Ergebnisse sind in Fig. 4 als Luciferasegesamtakti- 35

vität pro Probenvertiefung gegen die Menge des kationischen Lipids pro 1 µg DNA aufgetragen. Die optimale Expression der Luciferaseaktivität wird unter Verwendung eines Verhältnisses von DOTAP/DNA von 5 : 1 (Gew./Gew.) und von Verbindung 5 (1)/DNA von 7,5 : 1 (Gew./Gew.) erhalten. Das erhaltene Verhältnis entspricht einem Ladungsverhältnis von Lipid zu DNA von ungefähr 2 : 1 für DOTAP bzw. 5 : 1 für Verbindung (1) (unter der Annahme, daß 1 µg DNA 3,1 nm anionische Phosphatladungen enthält). Die Transfektion unter Vermittlung von 10 Verbindung (1) ist 10mal höher als mit DOTAP.

B) Ternärer Komplex mit Verbindung (1).

Zur Bestimmung des Einflusses der Peptidkonzentration auf die Transfektion von K562-Zellen, werden verschiedene Mengen von 15 HBV-Peptid mit 1 µg pCMVL gemischt, so daß sich ein Endvolumen von 100 µl ergibt und dann 10 min lang inkubiert. Dann werden 100 µl einer Lösung, die 10 µg Verbindung (1) enthält, unter Mischen zugegeben. Nach weiteren 10 min Inkubation wird die Transfektionslösung (200 µl) auf die Zellen aufgebracht. 20 Alle anderen Verfahrensbedingungen sind dieselben wie im vorigen Experiment beschrieben. Die Ergebnisse sind in Fig. 5 als Luciferasegesamtaktivität pro Probenvertiefung gegen die Menge an zugesetztem Peptid (pro 1 µg DNA) aufgetragen. 25 Die Ergebnisse zeigen, daß die optimale Menge des Peptids 2 µg beträgt und daß die Expression der Luciferase 3- bis 4mal höher ist als die bei Transfektion mit Verbindung (1) bzw. 30- bis 40mal höher als bei Transfektionen mit DOTAP.

γ) Dosisabhängigkeit.

30 Eine "Stamm"-Lösung wird aus 1 µg pCMVL, 2 µg HBV-Peptid und 10 µg Verbindung (1) in einem Endvolumen von 200 µl hergestellt. Die DNA-Dosisabhängigkeit wird bei der einstufigen Transfektion durch Zugeben von 5 bis 200 µl dieser Lösung zu den Zellen geprüft. Ergebnisse dieses Versuchs sind in Fig. 35 6 angegeben. Die Expression der Luciferaseaktivität hängt von der Menge der zugesetzten DNA ab und ist im Bereich von 0

bis 0,25  $\mu$ g DNA linear. Generell können unter diesen Bedingungen 0,5 ng Reporter-DNA (ohne Träger-DNA) nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse geben auch an, daß die ternären Komplexe, wenn sie einmal gebildet sind, sehr stabil 5 sind und bei Verdünnung nicht dissoziieren.

#### **Intrazelluläre Einführung von Oligonukleotiden**

##### **Beispiel 5**

10

Fluoresceinmarkiertes Phosphothioatoligonukleotid (5'-ACT TGG ATA CGC ACG-Fluorescein-3') wird verwendet, um die intrazelluläre Abgabe und Verteilung von Oligonukleotid in Gegenwart und Abwesenheit von Verbindung (1) zu bestimmen.

15

HeLa-Zellen (einen Tag vor dem Experiment auf Platten aufgebracht,  $2 \times 10^5$  Zellen pro Probenvertiefung, 6-Lochplatte) werden auf Glassobjektträgern in 2 ml RPMI 1640 versehen mit 10 % FCS kultiviert. Vor dem Versuch wird das Medium durch 20 RPMI 1640 ohne Serum ersetzt.

Die Bildung von Komplexen aus Oligonukleotid und Verbindung (1) wird wie folgt vorgenommen. 10  $\mu$ g Phosphothioatoligonukleotid wird in 90  $\mu$ l Transfektionspuffer aufgelöst. 16  $\mu$ g 25 und 50  $\mu$ g Verbindung (1) werden mit Transfektionspuffer auf ein Endvolumen von 100  $\mu$ l verdünnt. Die zwei Lösungen werden miteinander gemischt und 10 min inkubiert. Die Oligonukleotidlösung ohne Verbindung (1) wird mit 100  $\mu$ l Transfektionspuffer verdünnt. Die erhaltenen Lösungen (200  $\mu$ l pro Probenvertiefung) werden den Zellkulturen zugegeben (Endkonzentration des Oligonukleotids ungefähr 1  $\mu$ M, Verbindung (1) 8  $\mu$ M und 25  $\mu$ M). Die Komplexe werden mit den Zellen 4 Stunden lang inkubiert. Dann wird das Medium durch ein vollständiges Wachstumsmedium 30 ersetzt.

35

Nach 4 und 24 Stunden werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit 1 %iger Glutaraldehydlösung 15 min lang fixiert. Nach der Fixierung werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit Glycerinfixierlösung (10 mM Phosphat, 150 5 mM NaCl, 70 % Glycerin, pH 7,5) behandelt. Die Anordnung des fluoresceinmarkierten Phosphothioatoligonukleotids wird durch Fluoreszenzmikroskopie unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops von Zeiss bestimmt.

10 Die Inkubation von Zellen mit 1  $\mu$ M fluoresceinmarkiertem Oligonukleotid führte sowohl nach 4 wie nach 24 Stunden zu einer schwachen Fluoreszenz. Im Gegensatz dazu zeigten alle Zellen, die mit 1  $\mu$ M fluoresceinmarkiertem Oligonukleotid in Gegenwart von Verbindung (1) inkubiert werden, bei Cytoplasmaanfärbung nach 4 Stunden eine klare Kernfluoreszenz. 15 Nach 24 Stunden zeigten die Zellen sehr klare punktuelle Fluoreszenz im Cytoplasma. Die Fluoreszenzintensität ist in Gegenwart von 25  $\mu$ M Verbindung (1) höher.

20 Die in Gegenwart von Serum durchgeführten Experimente zeigten keine Veränderungen der Gesamtfluoreszenz und Verteilung des fluoresceinmarkierten Oligonukleotids.

#### **Intrazelluläre Einführung von anionischen Polypeptiden**

25

##### **Beispiel 6**

Ein fluoresceinmarkiertes anionisches Polypeptid (Fluorescein-poly(Glu)<sub>21</sub>) wird verwendet, um die intrazelluläre 30 Abgabe und Verteilung von anionischem Polypeptid in Gegenwart und Abwesenheit von Verbindung (1) zu untersuchen. Die Versuchsbedingungen sind genau dieselben wie beim zuvor beschriebenen Beispiel.

35 Inkubation von Zellen mit 1  $\mu$ M fluoresceinmarkiertem poly-(Glu)<sub>21</sub> führte weder nach 4 noch nach 24 Stunden zu einer

Fluoreszenz. Im Gegensatz dazu zeigten alle mit 1  $\mu$ M fluoresceinmarkiertem Oligonukleotid in Gegenwart von 25  $\mu$ M Verbindung (1) inkubierten Zellen klare punktuelle Cytoplasma-Fluoreszenz schon nach 45 min. Die Anordnung der Fluoreszenzvesikel ist etwas anders als bei dem mit fluoresceinmarkiertem Oligonukleotid. Nach 24 Stunden zeigten die Zellen sehr klare punktuelle Fluoreszenz im Cytoplasma, die höchstwahrscheinlich in denselben Strukturen angeordnet sind.

10 Beispiel 7

**Liposomformulierungen**

Die folgenden Zusammensetzungen zeigen die Verwendung der 15 Verbindungen dieser Erfindung in Formulierungen, die biologisch aktive Stoffe umfassen:

7.1 Eine topische Formulierung wird durch Auflösen von 0,25 mg Prednisolonacetat (21-Acetoxy-1,4-pregnadien-11 $\beta$ , 20 17 $\alpha$ -diol-3,20-dion) und 50 mg L-Lysin-bis(0,0'-oleoyl- $\beta$ -hydroxyethyl)amiddihydrochlorid in 2 ml Dichlormethan-/Ethanolösung (1 : 1) hergestellt. Das Lösemittel wird im Stickstoffstrom verdampft. Die Filmmischung wird über Nacht im Vakuum gehalten, um das restliche Lösemittel vollständig zu 25 verdampfen. Zur Liposomformulierung wird der trockene Film dann in 2 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung suspendiert und die erhaltene Lösung schallbehandelt bis sie sichtbar klar ist.

7.2 (+)- $\alpha$ -Tocopherol (5,7,8-Trimethyltocol, Vitamin E) 30 und 100 mg L-Lysin-bis(0,0'-oleoyl- $\beta$ -hydroxyethyl)amiddihydrochlorid werden in 5 ml Dichlormethan-/Ethanolösung (1 : 1) aufgelöst. Das Lösemittel wird im Stickstoffstrom verdampft und der Rest unter Vakuum verdampft. Der trockene Film wird dann in 4 ml 10 mM Hepes, 0,9 %iger NaCl bei pH 35 7,4 suspendiert und schallbehandelt bis sie sichtbar klar ist.

7.3 20 mg Retinol (3,7-Dimethyl-9-(2,6,6,-trimethyl-1-cyclohexenyl)-2,4,6,8-nonatetraen-1-ol) und 80 mg L-Lysin-bis(0,0'-myristoyl-β-hydroxyethyl)amiddihydrochlorid werden  
5 in 5 ml Dichlormethan-/Ethanollösung (1 : 1) aufgelöst. Das Lösemittel wird verdampft und der trockene Film über Nacht im Vakuum gehalten. Der Film wird dann in 5 ml 10 mM Tris, 0,9 %iger NaCl bei pH 7,4 suspendiert.

10

7.4 3 mg N-Palmitoyl-S(2,3-bis(palmitoyl-oxy)-(2RS)-propyl-R-cystein und 25 mg L-Lysin-bis(0,0'-palmitoyl-β-hydroxyethyl)amiddihydrochlorid werden in 5 ml Dichlormethan-/Ethanollösung (1 : 1) aufgelöst und unter Vakuum zur Trockene  
15 verdampft. Der erhaltene Film wird in 1 ml destilliertem Wasser suspendiert und mit Ultraschall behandelt bis die Suspension klar ist.

Neben den bisher beschriebenen Teilen umfaßt die Erfindung  
20 noch die Verwendung der erfundungsgemäßen Lipidverbindungen zur Einführung lipophiler Anteile in Peptide sowie die auf diese Weise hergestellten Lipopeptide. Nähere Einzelheiten ergeben sich aus dem folgenden:

## 25 Peptidsynthese

Allgemeine Vorgehensweise:

die Synthese von Peptiden mit lipophilen Modifikationen an ihren C- oder N-endständigen Gruppen oder beiden oder in der  
30 Kette wird durch schrittweise Syntheseverfahren ausgehend von Fmoc in der festen Phase unter Verwendung des automatischen Peptidsynthesegerätes ABI 350 oder des multiplen Peptidsynthesegeräts durchgeführt.

35 Die Peptide werden üblicherweise auf einem Rinkamid MBHA-Harz (4-(2',4'-Dimethoxyphenyl-Fmoc-aminomethyl)phenoxyacetamido-

norleucylmethylbenzhydrylaminharz, Novabiochem) oder einem Tritylharz (2-Chlortritylchloridharz, Novabiochem) angeordnet.

5 Die Kupplungen der Fmoc-Aminosäuren (10molarer Überschuß) werden mit N,N'-Diisopropylcarbodiimid (DIC) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT) in DMF üblicherweise in einer Stunde durchgeführt. Die Kupplungen der lipophilen Aminosäure-bis-  
10 hydroxyethylamide werden unter Verwendung eines dreifachen molaren Überschusses, mit demselben DIC/HOBt-Aktivierungsverfahren und einer Kupplungszeit von ungefähr 3 Stunden durchgeführt. Die Beendigung der Kupplung wird mit einem Ninhydrintest überprüft. Die Fmoc-Gruppe wird mit Piperidin:DMF = 1 : 2 in 15 min entfernt.

15 Abspaltung und Entfernung der Schutzgruppen wird in einer Mischung aus n-Kresol:Dimethylsulfid:Ethandithiol:TFA = 3:3:3:91 in zwei Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Abfiltrieren werden die Peptide aus der Mischung ausgefällt und mehrfach mit Diethylether gewaschen. Die rohen Peptide werden auf einer semipräparativen Säule mit Nucleosil C2 (8x250 mm) und mit einem aufsteigenden Gradienten von Acetonitril in Wasser, jeweils mit 0,1 % TFA, gereinigt. Die gereinigten Peptide werden aus der Mischung von tert-Butyl-  
20 alkohol:Wasser = 4:1 lyophilisiert und bei -4 °C aufbewahrt. Ihre Homogenität wird durch Aminosäureanalyse, analytische HPLC und Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie bestätigt.

25 30 Gemäß diesem Verfahren können die folgenden Lipopeptide hergestellt werden:  
GLFGAIAAGFIENGWEGLIDG-D(N(EtOPalm)<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub>  
E(N(EtOPalm)<sub>2</sub>)-MQRGGNFRNQRKMKVKGGRAPRKKG  
E(N(EtOMyr)<sub>2</sub>)-MQRGGNFRNQRKMKVKGGRAPRKKG  
35 GRGDSPGSG-D(N(EtOPalm)<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub>  
Acetyl-GRGDSPGSG-D(N(EtOPalm)<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub>

YNRNAVPNLRGDLQVLAQKVARTL-E(N(EtOPalm)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>  
E(N(EtOPalm)<sub>2</sub>-YNRNAVPNLRGDLQVLAQKVARTL-E(N(EtOPalm)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>  
YPS-E(N(EtOPalm)<sub>2</sub>-PDNPAGEDAPAAEDMARYYSALRHYINLITRQRY-NH<sub>2</sub>

5 Ferner umfaßt die Erfindung noch die Verwendung der erfindungsgemäßen Lipidverbindungen zur Einführung glycolipophiler Anteile in Peptide sowie die auf diese Weise hergestellten Glycolipopeptide. Nähere Einzelheiten ergeben sich aus dem folgenden:

10

**Synthese von Glycolipopeptiden:**

15

Lys(NH-Asn(Lactosyl))<sub>4</sub>-Lys<sub>2</sub>-Lys-Acx-bAla-Acx-E(N(EtOPalm)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>

1,8 g (5 mmol) D(+) -Lactosemonohydrat wird mit 40 ml gesättigter NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 6 Tage lang bei 30 °C umgesetzt. Zur Entfernung des überschüssigen NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> wird die Reaktionsmischung mit Wasser (20 ml) verdünnt und im Vakuum bis auf die Hälfte ihres ursprünglichen Volumens aufkonzentriert. Dieses Vorgehen wird 6 mal wiederholt. Schließlich wird das Wasser durch Lyophilisierung entfernt. Der erhaltene rohe Aminozucker wird ohne weitere Reinigung zur Synthese von Fmoc-Asn(lactose)-OtBu-Derivaten verwendet. 480 mg (1,17 mmol) Fmoc-Asp-OtBu und 228 mg (1,52 mmol) HOBr werden in DMF gelöst (5 ml) und nach Abkühlen auf 4 °C werden 205 mg (1,63 mmol) DIC zugegeben. Nach 15 min Rühren bei 4 °C und weitere 20 min bei 25 °C werden dem aktiven Ester 5,85 mmol rohe 1-Aminolactose in 6 ml DMF:H<sub>2</sub>O = 2:1 zugegeben. Nach 6 Stunden Rühren wird das Lösemittel im Vakuum verdampft und Diethyl-ether zugegeben. Das ausgefällt Produkt wird filtriert, mit kaltem Ether und kaltem Wasser gewaschen. Die tBu-Schutzgruppe wird durch 70 % TFA in Wasser abgespalten (20 min bei

Raumtemperatur). Nach Verdampfen der TFA-/Wassermischung im Vakuum wird das Produkt in tert-Butylalkohol:Wasser = 4:1 gelöst und lyophilisiert. Das rohe Fmoc-Asn(lactose)-OH wird durch Umkehrphasenchromatographie gereinigt (Säule Lichroprep 5 C18 25x310 mm, isokratische Elution bei 30 % Acetonitril/Wasser/0,1 % TFA), so daß 280 mg HPLC-reines Fmoc-Asn(lactose)-OH erhalten werden (Ausbeute 35 %, bezogen auf das Ausgangsprodukt Fmoc-Asp-OtBu. Analyse: +FAB-MS (MH<sup>+</sup>) = 679 (berechnet = 679), Rt = 6,59 min auf Nucleosil C18 4x150 mm, Gradiert 30-100 % Acetonitril/0,1 % TFA in Wasser/0,1 % TFA in 30 min).

32,5 mg (0,048 mmol) Fmoc-Asn(lactose)-OH und 7,25 mg (0,05 mmol) HOBt werden in 200 µl DMF gelöst und 6,31 mg (0,05 mmol) DIC zugegeben. Nach 30 min Rühren wird der gebildete aktive Ester über Nacht mit 30 mg (0,016 mmol) Boc-(Lys(NH<sub>2</sub>))<sub>4</sub>-Lys<sub>2</sub>-Lys-Acx-bAla-Acx-E(N(EtOPalm)<sub>2</sub>-peptidylharz gekuppelt. Das Harz wird sorgfältig gewaschen und die Fmoc-Gruppe durch Behandlung mit 20 %igem Piperidin entfernt. Das 20 Glycopeptid wird abgespalten, von Schutzgruppen befreit und unter identischen Bedingungen wie oben beschrieben aufgearbeitet. Schließlich wird es durch semipräparative HPLC gereinigt, so daß 10,6 mg N-Lactosyliertes Lipopeptid erhalten werden.

25 Figur 1 der beigefügten Schaubilder zeigt die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Menge an zugesetzter Verbindung (1)

30 Figur 2 zeigt den Einfluß des Verhältnisses von DOTAP/DNA und Verbindung 1/DNA auf die Transfektion von HeLa-Zellen. Die Transfektion von Verbindung (1) ist in Gegenwart (■) und in Abwesenheit (○) von Serum dargestellt. Die DOTAP-Transfektion ist in Gegenwart (●) und in Abwesenheit (○) von Serum dargestellt. Die Transfektionswerte sind als Gesamtlichteinheiten 35 pro 50000 Zellen angegeben. Jeder Punkt soll den Mittelwert

± SD von drei Transfektionen darstellen.

Figur 3 zeigt den durch Peptid verstärkten Gentransfer auf HeLa-Zellen. Transfektionswerte sind als Prozentsatz des bei 5 DOTAP-Transfektion erhaltenen Wertes angegeben und zeigen den Mittelwert von drei Transfektionen.

Figur 4 zeigt den Einfluß des Verhältnisses von DOTAP (●)/DNA und Verbindung 1(■)/DNA auf die Transfektion von K562-Zellen. 10 Die Transfektionswerte sind als Gesamtlichteinheiten pro 500000 Zellen angegeben. Jeder Punkt bedeutet den Mittelwert ± SD von drei Transfektionen.

Figur 5 zeigt den durch Peptid verstärkten Gentransfer auf 15 K562-Zellen. Die Transfektionswerte sind als Gesamtlichteinheiten pro 500000 Zellen angegeben und zeigen den Mittelwert ± SD von drei Transfektionen.

Figur 6 zeigt die Transfektionswerte gegen die Menge an 20 zugesetzter DNA. Die Transfektionswerte sind als Gesamtlichteinheiten pro 500000 Zellen angegeben und bedeuten den Mittelwert ± SD von drei Transfektionen.

25

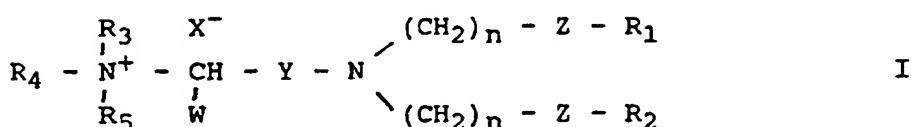
30

35

## Patentansprüche

## 1. Verbindung der Formel

5



10

oder ein optisches Isomer davon, worin

- R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> gleich oder verschieden sind und eine Alkyl-, Alkenyl- oder Alkinylgruppe mit 6 bis 24 Kohlenstoffatomen sind;
- R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> und R<sub>5</sub> gleich oder verschieden sind und Wasserstoff, Alkyl oder Alkylamin, jeweils mit 1 bis 8 Kohlenstoffatomen, oder eine Aminosäure, ein Aminosäurederivat, ein Peptid oder ein Peptid-derivat sind;
- W Wasserstoff, ein Carboxylrest oder ein Seitenkettenrest von Aminosäuren, Aminosäurederivaten, Peptiden oder Peptidderivaten ist;
- Y eine Verbindungsgruppe mit mindestens einem Atom, das nicht Wasserstoff ist, insbesondere -CO-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO-, -(CH<sub>2</sub>-)<sub>m</sub>, -(CHOHCH<sub>2</sub>-)<sub>m</sub>, jeweils mit m gleich 1 bis 20, -CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-SO-CH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>- oder -SO<sub>2</sub>- ist;
- Z eine Ester-, Ether- oder Amidbindung ist;
- n gleich 1 bis 8 ist; und
- X ein Anion, insbesondere ein pharmazeutisch annehmbares Anion ist.

2. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß  
35 Y Carbonyl, d. h. -CO- ist.

3. Verbindung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß Z eine Esterbindung ist.
4. Verbindung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> eine Alkyl- oder Alkenylgruppe mit 10 bis 20, vorzugsweise 12 bis 18 Kohlenstoffatomen sind, wobei insbesondere R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> gleich sind.
- 10 5. Verbindung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> eine Alkenylgruppe sind.
- 15 6. Verbindung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß n gleich 2 ist.
7. Verbindung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß W der Seitenkettenrest einer basischen Aminosäure, insbesondere von Lysin oder  
20 Ornithin ist.
8. Verbindung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> und R<sub>5</sub> Wasserstoff sind.
- 25 9. Verbindung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß X das Chloridion ist.
10. Verbindung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung ausgewählt ist aus  
30 L-Lysin-bis-(0,0'-cis-9-octadecenoyl-β-hydroxyethyl)-amiddihydrochlorid oder einem optischen Isomer davon,  
L-Lysin-bis-(0,0'-hexadecanoyl-β-hydroxyethyl)amid-dihydrochlorid oder einem optischen Isomer davon,  
35

L-Ornithin-bis-(0,0'-cis-9-octadecenoyl-β-hydroxyethyl)-amiddihydrochlorid oder einem optischen Isomer davon,  
L-Ornithin-bis-(0,0'-hexadecanoyl-β-hydroxyethyl)amid-dihydrochlorid oder einem optischen Isomer davon,  
5 L-Lysin-bis-(0,0'-tetradecanoyl-β-hydroxyethyl)amid-dihydrochlorid oder einem optischen Isomer davon,  
L-Ornithin-bis-(0,0'-tetradecanoyl-β-hydroxyethyl)amid-dihydrochlorid oder einem optischen Isomer davon.

10 11. Verbindung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung L-Lysin-bis-(0,0'-cis-9-octadecenoyl-β-hydroxyethyl)amid-dihydrochlorid oder ein optisches Isomer ist.

15 12. Polyanion-Lipid-Komplex aus einem Polyanion und mindestens einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 11.

13. Komplex nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß er  
20 eine positive Gesamt- bzw. Nettoladung besitzt.

14. Komplex nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß das Polyanion ein Polynukleotid ist.

25 15. Komplex nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß das Polyanion DNA oder RNA ist.

16. Komplex nach einem der Ansprüche 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß das Polyanion ein Polypeptid ist.  
30

17. Komplex nach einem der Ansprüche 12 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß das Lipid die Verbindung nach Anspruch 11 oder ein optisches Isomer davon ist.

35 18. Ternärer Polyanion-Polykation-Lipid-Komplex aus einem

Polyanion, einem Polykation und mindestens einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 11.

19. Komplex nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß er eine positive Gesamt- bzw. Nettoladung besitzt.  
5
20. Komplex nach Anspruch 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß das Polyanion ein Polynukleotid ist.
- 10 21. Komplex nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß das Polyanion DNA oder RNA ist.
22. Komplex nach einem der Ansprüche 18 oder 21, dadurch gekennzeichnet, daß das Polykation ein Polypeptid ist.  
15
23. Komplex nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid mindestens eine der folgenden Aminosäuresequenzen umfaßt:
  - a) GRSPRRRTPSPRRRSQSPRRRSQS,
  - b) RRRRSQSPRRRSQS,
  - c) PKKKRKVPGSGRSPPRRTPSPRRRSQSPRRRSQS,
  - d) PKKKRKVPGSGRRRSQSPRRRSQS,
  - d) GRAPRRRTPAPRRRAQAPRRRAQA,
  - eine Protaminsequenz,
  - eine Histonsequenz.  
25
24. Komplex nach einem der Ansprüche 18 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß das Lipid die Verbindung nach Anspruch 11 oder ein optisches Isomer davon ist.  
30
25. Verfahren zur Herstellung eines Komplexes nach einem der Ansprüche 12 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine positiv geladene Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 11 oder eine Zusammensetzung, die mindestens eine solche Verbindung enthält, mit einem Polyanion in Kontakt gebracht wird.  
35

26. Verfahren zur Herstellung eines Komplexes nach einem der Ansprüche 18 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß das Polyanion mit dem Polykation in Kontakt gebracht wird und der daraus resultierende Polyanion-Polykation-Komplex mit mindestens einer positiv geladenen Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 11 oder einer Zusammensetzung, die diese Verbindung enthält, in Kontakt gebracht wird.
- 10 27. Liposom hergestellt mit mindestens einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 11 oder einer Zusammensetzung, die mindestens eine solche Verbindung enthält.
- 15 28. Liposom-Formulierung in wässriger Lösung umfassend
  - mindestens eine biologisch aktive Substanz, und
  - eine Lipidkomponente, enthaltend mindestens eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 11.
- 20 29. Liposom-Formulierung nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß die biologisch aktive Substanz in einer Menge bis zu 10 Gew.-% vorhanden ist.
- 25 30. Liposom-Formulierung nach Anspruch 28 oder 29, dadurch gekennzeichnet, daß die Lipidkomponente in einer Menge von 1 bis 20 Gew.% vorhanden ist.
- 30 31. Liposom-Formulierung nach Anspruch 28 bis 30, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung in der Lipidkomponente 1 % bis 100 % dieser Komponente umfaßt.
- 35 32. Liposom-Formulierung nach Anspruch 28 bis 31, dadurch gekennzeichnet, daß die biologisch aktive Substanz ein Arzneistoff ist.

33. Verfahren zum Transport eines Polyanions oder Polykations durch eine biologische Membran, insbesondere zum Einbringen eines Polyanions oder Polykations in eine Zelle, wobei das Polyanion oder Polykation unter Verwendung mindestens einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 11 komplexiert wird und der gebildete Komplex mit der Membran in Kontakt gebracht, insbesondere die Zelle mit dem Komplex inkubiert wird.  
5
- 10 34. Verfahren nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß der Komplex eine positive Gesamt- bzw. Nettoladung besitzt.
- 15 35. Verfahren nach Anspruch 33 oder 34, dadurch gekennzeichnet, daß als Komplex ein Komplex nach einem der Ansprüche 12 bis 17 gebildet und eingesetzt wird.
- 20 36. Verfahren nach Anspruch 33 oder 34, dadurch gekennzeichnet, daß als Komplex ein Komplex nach einem der Ansprüche 18 bis 24 gebildet und eingesetzt wird.
- 25 37. Verfahren nach einem der Ansprüche 33 bis 36, dadurch gekennzeichnet, daß das in Kontakt bringen, insbesondere Inkubieren in vitro erfolgt.
- 30 38. Verfahren nach einem der Ansprüche 33 bis 36, dadurch gekennzeichnet, daß das in Kontakt bringen, insbesondere Inkubieren in vivo erfolgt.
- 35 39. Verfahren zum Transport einer biologisch aktiven Substanz durch eine biologische Membran, insbesondere zum Einbringen einer biologisch aktiven Substanz in eine Zelle, wobei aus mindestens einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 11 und einer biologisch aktiven Substanz ein Liposom gebildet wird und dieses Liposom mit

der Membran in Kontakt gebracht, insbesondere die Zelle mit dem Liposom inkubiert wird.

40. Verfahren nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der biologisch aktiven Substanz um einen Arzneistoff handelt.
41. Verfahren nach Anspruch 39 oder 40, dadurch gekennzeichnet, daß das in Kontakt bringen, insbesondere Inkubieren in vitro erfolgt.
42. Verfahren nach Anspruch 39 oder 40, dadurch gekennzeichnet, daß das in Kontakt bringen, insbesondere Inkubieren in vivo erfolgt.

15

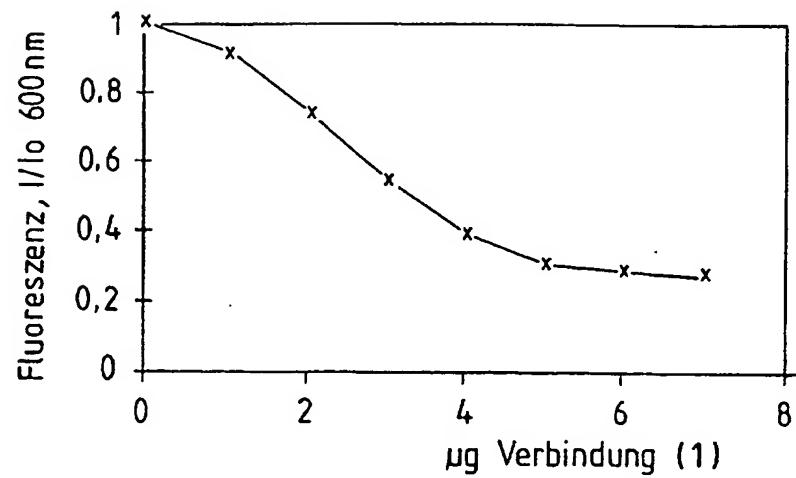
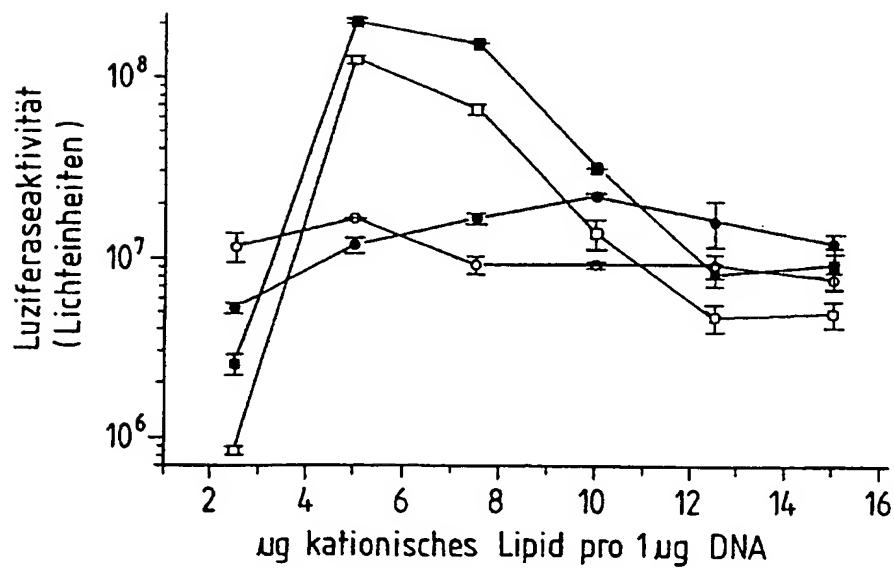
20

25

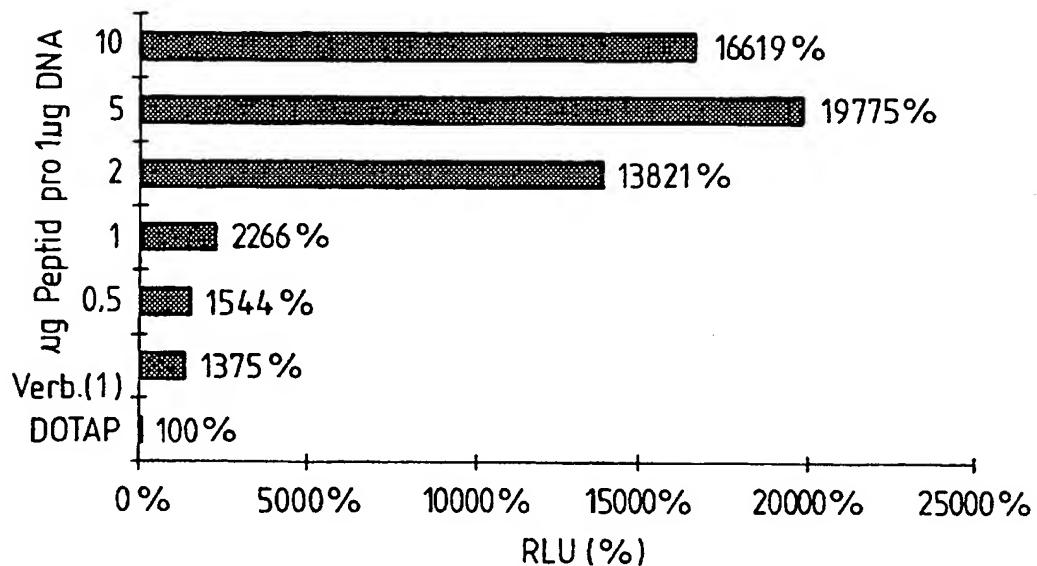
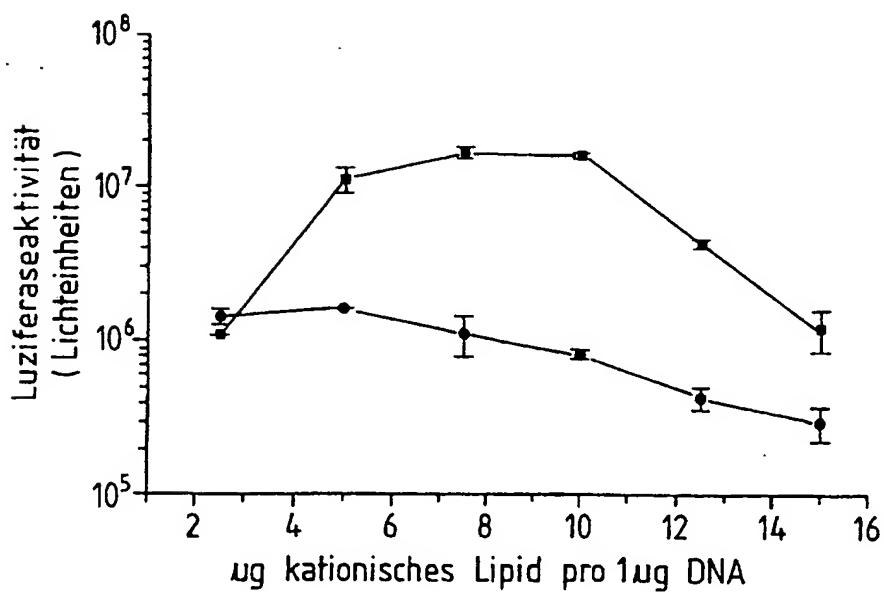
30

35

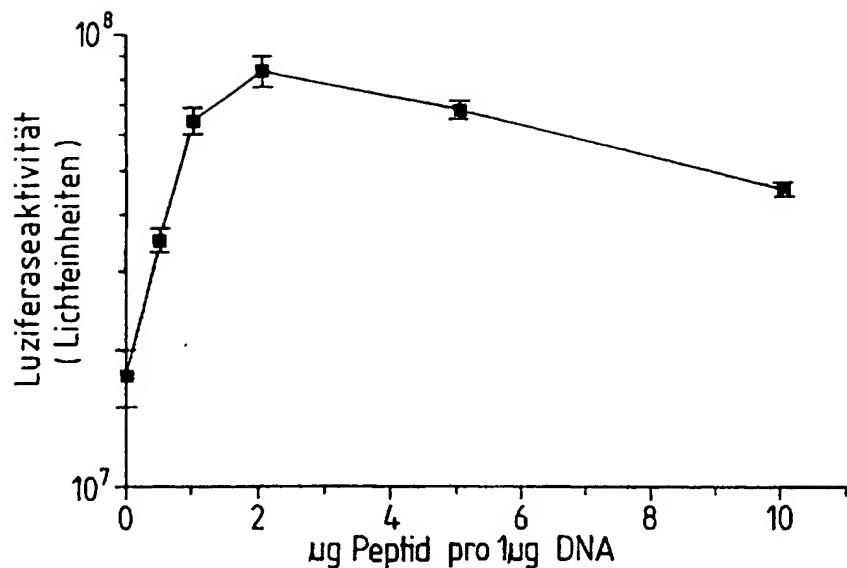
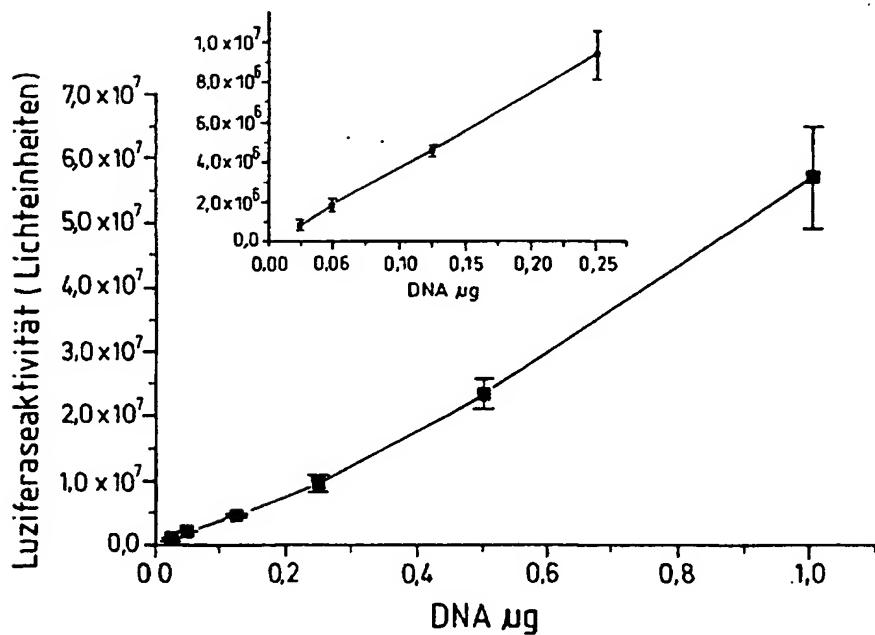
1/3

**Fig. 1****Fig. 2**

2/3

***Fig. 3******Fig. 4***

3/3

**Fig. 5****Fig. 6**

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation<sup>6</sup> : C07C 237/08, 279/14, 271/22, C12N 15/87, 15/88, A61K 9/127</p>		A3	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/30024 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 21. August 1997 (21.08.97)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/00629 (22) Internationales Anmeldedatum: 12. Februar 1997 (12.02.97)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 196 05 175.4 13. Februar 1996 (13.02.96) DE</p> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: SOUROVOI, Andrej [RU/DE]; Kapuzinergasse 18, D-72108 Rottenburg (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): JUNG, Guenther [DE/DE]; Ob der Gräfenhalde 5, D-72076 Tübingen (DE).</p> <p>(74) Anwälte: RUFF, Michael usw.; Willy-Brandt-Strasse 28, D- 70173 Stuttgart (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ARIPO Patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p> <p>(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchen- berichts: 25. September 1997 (25.09.97)</p>	
<p>(54) Title: LIPIDS AND THEIR USE, FOR EXAMPLE, IN LIPOSOMES</p> <p>(54) Bezeichnung: LIPIDVERBINDUNGEN UND DEREN VERWENDUNG Z.B. IN LIPOSOMEN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns lipids suitable for the transport of biologically active substances or molecules in cells. A preferred lipid is L-lysine-bis-(O,O'-<i>cis</i>-9-octadecenoyl-<math>\beta</math>-hydroxyethyl) amide dihydrochloride or one of its optical isomers. In addition, the invention concerns complexes of such lipids with polyanions such as DNA and RNA, and ternary complexes of the lipids described with polyanions and polycations. Finally, the invention concerns liposome formulations made from biologically active substances and the lipids described, as well as methods of transporting polyanions, polycations or biologically active substances through biological membranes by means of these lipids.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung betrifft neue Lipidverbindungen, die zum Transport biologisch aktiver Substanzen oder Moleküle in Zellen geeignet sind. Eine bevorzugte Verbindung nach der Erfindung ist L-Lysin-bis-(O,O'-<i>cis</i>-9-octadecenoyl-<math>\beta</math>-hydroxyethyl)amid-dihydrochlorid oder ein optisches Isomer davon. Weiter umfaßt die Erfindung Komplexe aus den neuen Lipidverbindungen mit Polyanionen wie beispielsweise DNA oder RNA, sowie ternäre Komplexe aus den neuen Lipidverbindungen mit Polyanionen und Polykationen. Schließlich werden neben Liposom-Formulierungen aus biologisch aktiven Substanzen und den neuen Lipidverbindungen auch Verfahren zum Transport von Polyanionen, Polykationen oder biologisch aktiven Substanzen durch biologische Membranen mit Hilfe der neuen Lipidverbindungen beschrieben.</p>			

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Burbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estonien	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: Application No  
PCT/EP 97/00629

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 IPC 6 C07C237/08 C07C279/14 C07C271/22 C12N15/87 C12N15/88  
 A61K9/127

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 IPC 6 C07C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	- / --	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*'E' earlier document but published on or after the international filing date
- \*'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*'A' document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
1 August 1997	08.08.97
Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Pauwels, G

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No
PCT/EP 97/00629

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 114, no. 9,  4 March 1991  Columbus, Ohio, US;  abstract no. 76422,  YAGI, KUNIO ET AL: "Introduction of DNA  into mammalian cells with liposomes or  lipid suspension"  XP002032761  see abstract  &amp; JP 02 135 092 A (VITAMIN KENKYUSHO K.  K., JAPAN)  &amp; RN:107066-27-3  Ethanaminium,  2-[bis[2-[(1-oxononadecyl)-  oxy]ethyl]amino]-N,N,N-trimethyl-2-oxo-,  bromide  &amp; RN:100993-84-8  Ethanaminium,  2-[bis[2-[(1-oxododecyl)oxy]  ethyl]amino]-N,N,N-trimethyl-2-oxo-,  chloride</p> <p>---</p>	1-42
X	<p>ACS SYMP. SER. (1986), 311(PHENOM. MIXED  SURFACTANT SYST.), 270-82 CODEN:  ACSMC8;ISSN: 0097-6156,  1986, XP000675553  SHIRAHAMA, KEISHIRO ET AL: "The growth of  molecular assemblies in mild surfactant  solutions"  see page 272, paragraph 3  see page 273; example III</p> <p>---</p>	1-4,6,9, 27
X	<p>PATENT ABSTRACTS OF JAPAN  vol. 95, no. 3, 28 April 1995  &amp; JP 06 340598 A (LION CORP.)  see abstract</p> <p>---</p>	1,3,4,6, 9
X	<p>JP 60 228 564 A (TOKUYAMA SODA) 13  November 1985  see page 12</p> <p>---</p>	1-4,6,7, 9
X	<p>JP 61 037 892 A (TOKUYAMA SODA CORP.) 22  February 1986  see page 36</p> <p>---</p>	1-4,6,7, 9
X	<p>WO 89 08098 A (THE UPJOHN COMPANY) 8  September 1989  see page 60, line 36 - line 37</p> <p>---</p>	1,4,6,8
		-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No  
PCT/EP 97/00629

## C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MEMOIRS OF THE FACULTY OF ENGINEERING, KYUSHU UNIVERSITY, vol. 46, no. 2, 1986, pages 221-243, XP000675628 T. KUNITAKE ET AL.: "dsc studies of the phase transition behavior of synthetic bilayer membranes. Part I Bilayer membranes of double chain amphiphiles" see page 233 see page 224 - page 225; table 4 -----	1,3,4,6, 9

1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. Application No

PCT/EP 97/00629

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 60228564 A	13-11-85	JP 1374581 C JP 61040709 B	22-04-87 10-09-86
JP 61037892 A	22-02-86	JP 1709338 C JP 3080187 B	11-11-92 24-12-91
WO 8908098 A	08-09-89	AU 3203489 A EP 0424385 A JP 3502796 T US 5192798 A	22-09-89 02-05-91 27-06-91 09-03-93

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internz. Ies Aktenzeichen  
PCT/EP 97/00629

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 C07C237/08 C07C279/14 C07C271/22 C12N15/87 C12N15/88  
A61K9/127

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprässtoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07C

Recherchierte aber nicht zum Mindestprässtoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
	-/-	

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- \*'A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*'E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \*'L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*'O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*'P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- \*'T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- \*'X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- \*'Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- \*'&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
1. August 1997	08.08.1997
Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Pauwels, G

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Interne	Ies Aktenzeichen
PCT/EP 97/00629	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 114, no. 9,  4.März 1991  Columbus, Ohio, US;  abstract no. 76422,  YAGI, KUNIO ET AL: "Introduction of DNA  into mammalian cells with liposomes or  lipid suspension"  XP002032761  siehe Zusammenfassung  &amp; JP 02 135 092 A (VITAMIN KENKYUSHO K.  K., JAPAN)  &amp; RN:107066-27-3  Ethanaminium,  2-[bis[2-[(1-oxononadecyl)-  oxy]ethyl]amino]-N,N,N-trimethyl-2-oxo-,  bromide  &amp; RN:100993-84-8  Ethanaminium,  2-[bis[2-[(1-oxododecyl)oxy]  ethyl]amino]-N,N,N-trimethyl-2-oxo-,  chloride  ---</p>	1-42
X	<p>ACS SYMP. SER. (1986), 311(PHENOM. MIXED  SURFACTANT SYST.), 270-82 CODEN:  ACSMC8;ISSN: 0097-6156,  1986, XP000675553  SHIRAHAMA, KEISHIRO ET AL: "The growth of  molecular assemblies in mild surfactant  solutions"  siehe Seite 272, Absatz 3  siehe Seite 273; Beispiel III  ---</p>	1-4,6,9, 27
X	<p>PATENT ABSTRACTS OF JAPAN  vol. 95, no. 3, 28.April 1995  &amp; JP 06 340598 A (LION CORP.)  siehe Zusammenfassung  ---</p>	1,3,4,6, 9
X	<p>JP 60 228 564 A (TOKUYAMA SODA)  13.November 1985  siehe Seite 12  ---</p>	1-4,6,7, 9
X	<p>JP 61 037 892 A (TOKUYAMA SODA CORP.)  22.Februar 1986  siehe Seite 36  ---</p>	1-4,6,7, 9
X	<p>WO 89 08098 A (THE UPJOHN COMPANY)  8.September 1989  siehe Seite 60, Zeile 36 - Zeile 37  ---</p>	1,4,6,8
		-/-

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat'les Aktenzeichen  
PCT/EP 97/00629

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>MEMOIRS OF THE FACULTY OF ENGINEERING, KYUSHU UNIVERSITY, Bd. 46, Nr. 2, 1986, Seiten 221-243, XP000675628</p> <p>T. KUNITAKE ET AL.: "dsc studies of the phase transition behavior of synthetic bilayer membranes. Part I Bilayer membranes of double chain amphiphiles" siehe Seite 233 siehe Seite 224 - Seite 225; Tabelle 4 -----</p>	1,3,4,6, 9
1		

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internes Aktenzeichen	les Aktenzeichen
PCT/EP 97/00629	

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
JP 60228564 A	13-11-85	JP 1374581 C JP 61040709 B	22-04-87 10-09-86
JP 61037892 A	22-02-86	JP 1709338 C JP 3080187 B	11-11-92 24-12-91
WO 8908098 A	08-09-89	AU 3203489 A EP 0424385 A JP 3502796 T US 5192798 A	22-09-89 02-05-91 27-06-91 09-03-93